

# 学 位 論 文

## Doctral Thesis

論文題名 : 光計測による聴覚皮質領野同定と各領野における活動潜時の解析  
(Identification of subfields in guinea pig auditory cortex and latency analyses)

著者名 : 西村方孝  
Masataka Nishimura

指導教員名 : 熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻知覚生理学  
宋文杰 教授

審査委員名 : 脳回路構造学担当教授 玉巻 伸章  
分子生理学担当教授 富澤 一仁  
脳神経外科学担当教授 倉津 純一  
形態構築学担当教授 福田 孝一

2011年3月

## 目次

目次.....	- 1 -
1 要旨 .....	- 3 -
2 学位論文の骨格となる参考論文.....	- 5 -
2.1 関連論文 および 参考論文.....	- 5 -
2.2 その他の論文リスト .....	- 5 -
3 謝辞 .....	- 6 -
4 略語一覧 .....	- 7 -
5 研究の背景と目的.....	- 9 -
6 実験方法 .....	- 11 -
6.1 実験動物.....	- 11 -
6.2 光計測 .....	- 13 -
6.3 音刺激 .....	- 16 -
6.4 データ解析 .....	- 17 -
7 実験結果 .....	- 19 -
7.1 AI とその周辺領野の同定 .....	- 19 -
7.2 DC とその周辺領野の同定 .....	- 28 -
7.3 同定された各領野における活動潜時の比較.....	- 36 -
7.3.1 AI と DC .....	- 37 -
7.3.2 周辺領野.....	- 41 -
8 考察 .....	- 44 -
8.1 AI とその周辺領野 .....	- 44 -
8.2 DC とその周辺領野 .....	- 46 -

8.3	モルモット聴覚皮質.....	- 47 -
8.4	活動潜時と聴覚情報処理.....	- 48 -
9	結語.....	- 53 -
10	参考文献.....	- 54 -

## 1 要旨

ヒトを含む多くの哺乳類の聴覚皮質は、一次聴覚野が含まれるコア領域とそれを取り囲むベルト領域で構成されており、それらが音の記憶や認知に関わっていることが知られているものの、聴覚情報処理におけるそれらの領野の機能的役割はほとんど解明されていない。聴覚皮質各領野の機能の解明を進める方法の一つとして、一個体に対して各領野の同定を行い、特定の一つの領野または特定された複数の領野を対象にして、更に詳細な神経細胞の活動や領野間の神経連絡を電気生理学的・解剖学的手法によって明らかにする方法が考えられる。モルモット聴覚皮質の領野同定に関する研究では、微小電極による記録や光計測法によるいくつかの報告があるが、それらの領野構成は報告により異なっている。本研究では、膜電位感受性色素を用いて、音刺激によって惹起されたモルモット聴覚皮質の活動を光信号として記録し、応答振幅と活動潜時の二つの指標を用いて定量的に聴覚皮質の領野を同定することを試みた。その結果、微小電極を用いた従来の研究結果を包含する新たな領野区分が明らかになった。一次聴覚野周辺においては、従来の報告では腹吻側ベルトと定義されていた領野が、腹吻側領野と腹尾側領野の二つに分かれていることが明らかになり、それらの領野は鏡像対称なトノピー構造を有していた。また、一次聴覚野と背尾側領野の境界腹側に位置する中間領野がトノピー構造を有している

ことが新たに判明した。背尾側領野周辺においては、活動潜時と応答振幅の二つの指標による解析から、背尾側領野とその周辺のベルト領域の明瞭な境界線の決定に成功し、従来の微小電極による領野同定の報告にある背尾側ベルトと腹尾側ベルトの中間にあたる部位では、背尾側領野のそれと同様のトノトピー勾配をもつ後側領野の存在を確認した。

同定された聴覚皮質各領野の特徴付けの一つとして、区分された各領野における最短潜時の周波数依存性の有無、それらの領野での同一個体における相対的な活動潜時の差、及びその差の周波数依存性を調べた。その結果、他の哺乳類のコア領域で見られる周波数依存的な活動潜時の変化（同調している音の周波数が高いほど、その同調している音に対する細胞の活動潜時が短い）と同等の周波数依存性がモルモット聴覚皮質のコア領域でも見られた。また、コア領域内領野間の活動潜時の差、およびその周波数依存性が、モルモットの聴覚皮質において初めて明らかになった。ベルト領域に存在する各領野については、活動潜時の顕著な周波数依存性は見られなかったものの、そのうちの一つである後側領野の活動潜時は AI や DC の活動潜時と高い相関関係が見られた。

光計測法による聴覚皮質の領野同定は十分可能であり、その分解能の高さから、未知の領野や各領野における未知の特徴が明らかになる可能性が示された。

## 2 学位論文の骨格となる参考論文

### 2.1 関連論文 および 参考論文

**Nishimura M, Shirasawa H, Kaizo H, Song WJ.** New field with tonotopic organization in guinea pig auditory cortex. J Neurophysiol. 97(1):927-32, 2007.

### 2.2 その他の論文リスト

**Nishimura M, Shirasawa H, Song WJ.** A light-emitting diode light source for imaging of neural activities with voltage-sensitive dyes. Neurosci Res. 54(3):230-4, 2006.

**Song WJ, Kawaguchi H, Totoki S, Inoue Y, Katura T, Maeda S, Inagaki S, Shirasawa H, Nishimura M.** Cortical intrinsic circuits can support activity propagation through an isofrequency strip of the guinea pig primary auditory cortex. Cereb Cortex. 16(5):718-29, 2006.

**Saitoh K, Inagaki S, Nishimura M, Kawaguchi H, Song WJ.** Spontaneous activity resembling tone-evoked activity in the primary auditory cortex of guinea pigs. Neurosci Res. 68(2):107-13, 2010.

### 3 謝辞

本研究の遂行にあたって、終始熱心にご指導いただいた熊本大学大学院医学教育部医学専攻知覚生理学分野教授 宋文杰 先生に深謝の意を表す。本研究に関する議論や提案をいただいた大阪大学大学院工学研究科教授 八木哲也 先生をはじめとする同研究室の皆様感謝の意を表す。

本研究の一部は日本学術振興会特別研究員奨励費 (#203900) によった。

#### 4 略語一覧

**AI** primary auditory area; 一次聴覚野。モルモットの聴覚皮質コア領域の一つ。

**DC** dorsocaudal area; 背尾側領野。AI とならぶ聴覚皮質コア領域の一つ。

**VRB** ventrorostral belt; 腹吻側ベルト。聴覚皮質ベルト領域の一つの領野。

Wallace ら (2000) の定義による。

**VR** ventrorostral field; 腹吻側領野。聴覚皮質ベルト領域の一つの領野。従来 VRB だとされていた領野内に存在していたトノトピー構造を有する二つの領野のうちの一つ。

**VC** ventrocaudal field; 腹尾側領野。聴覚皮質ベルト領域の一つの領野。従来 VRB だとされていた領野内に存在していたトノトピー構造を有する二つの領野のうちの一つ。

**S** small field; 小領野。聴覚皮質ベルト領域の一つの領野。Redies ら (1989) の定義、および Wallace ら (2000) の定義による。

**R** rostral small field; 吻側小領野。著者らの定義による AI 吻側に隣接または AI に部分的に包含されていた小領野。

**T** intermediate zone; 中間領野。聴覚皮質ベルト領域の一つの領野。AI と DC の境界付近から腹側に位置している。Wallace ら (2000) の定義による。本研究にお



いてそのトノトピー構造が初めて示された。

**DCB** dorsocaudal belt; 背尾側ベルト。聴覚皮質ベルト領域の一つの領野。

Wallace ら (2000) の定義による。

**VCB** ventrocaudal belt; 腹尾側ベルト。聴覚皮質ベルト領域の一つの領野。

Wallace ら (2000) の定義による。

**P** posterior field; 後側領野。聴覚皮質ベルト領域の一つの領野。Horikawa ら (2001) の定義による。

**dB** decibel; デシベル。

**SPL** sound pressure level; 音圧レベル。0 dB SPL は 20  $\mu$ Pa。

**Oct** octave; オクターブ。

**CMOS** complementary metal-oxide semiconductor; 相補性金属酸化膜半導体。

**PC** personal computer; 計算機。

**ECG** electrocardiogram; 心電図。

**F<sub>0</sub>** basal fluorescence level; 基底蛍光量。

$\Delta$ F fluorescence level change from F<sub>0</sub>; 蛍光量変化。

**GP** guinea pig; モルモット。

**SD** standard deviation; 標準偏差。

## 5 研究の背景と目的

ヒトを含む多くの哺乳類の聴覚皮質は、一次聴覚野が含まれるコア領域とそれを取り囲むベルト領域で構成されている ([Merzenich and Brugge 1973](#); [Hellweg et al. 1977](#); [Reale and Imig 1980](#); [Redies et al. 1989](#); [Wallace et al. 2000](#); [Kaas and Hackett 2000](#); [Hackett et al. 2001](#); [Rutkowski et al. 2003](#); [Humphries et al. 2010](#))。電気生理学的には、コア領域での顕著なトノピー (皮質の空間座標による音周波数の表現)、または個々の細胞での音の周波数に対する比較的鋭い同調が報告されており、ベルト領域においては、音の周波数に対する緩やかな同調や、単一周波数の音と比較したときの広帯域雑音へのより強い応答等が知られている ([Wallace et al. 2000](#); [Polley et al. 2007](#))。また、皮質の破壊実験や皮質の可逆的な不活性化による動物の行動や神経活動の変化から、聴覚皮質が音の記憶や認知に関わっていることは明らかになっているものの ([Talwar et al. 2001](#); [Cooke et al. 2007](#); [Lomber and Malhotra. 2008](#))、聴覚情報処理におけるそれらの領野の役割はほとんど解明されていない。聴覚皮質各領野の機能の解明を進めるためには、一対して各領野の同定を行い、特定の領野に対して、活動の操作 (例: 不活性化)、活動の記録、領野間の連絡を、例えば電気生理学的または解剖学的手法によって調べる必要があると考えられる。モルモット聴覚皮質の領野同定に関する研究では、[Horikawa ら \(2001\)](#) が光計測法を用

いてモルモット聴覚皮質の純音刺激に対する応答を記録し、その応答の振幅をある閾値で処理することにより聴覚皮質各領野を区分したが、微小電極を用いて区分された同聴覚皮質の領野 ([Redies et al. 1989](#); [Wallace et al. 2000](#)) と比較すると、各領野の大きさやその相対的位置が多くの領野について異なり、背尾側領野 (dorsocaudal area; DC) と DC 周辺に存在する各領野の境界や一次聴覚野 (primary auditory area; AI) と DC の境界は明確に定義されていない。また、[Wallace ら \(2000\)](#) の報告にある AI と DC の境界付近の腹側ベルト領域に位置する中間領野は [Horikawa ら \(2001\)](#) の報告では見られていない。

これらの差異を解消するため、本研究では、時間分解能が高い膜電位感受性色素を用いた光計測により、1 画素あたり概ね  $62.5 \times 62.5 \mu\text{m}^2$  の範囲内にある細胞の活動を関知する  $10^4$  画素を有する撮像素子を用いて、モルモット聴覚皮質の音刺激によって惹起された活動を記録し、応答振幅のみならず活動潜時を指標として、聴覚皮質の各領野を定量的に区分することを目的とした。さらに、聴覚皮質各領野の特徴付けの一つとして、区分された各領野における活動の最短潜時の周波数依存性を、等音圧刺激および等体温条件下で調べ、各領野における最短潜時の周波数依存性の有無、それらの領野での同一個体における相対的な活動潜時の差、及びその差の周波数依存性を明らかにすることを目的とした。

## 6 実験方法

### 6.1 実験動物

本研究における全ての実験は、『熊本大学動物実験等に関する規則』に則って行われた。実験にはプライエル反射陽性な Hartley モルモット (6~7 週齢、雌雄は問わない) が用いられた。動物ははじめ、ケタミン (46 mg/kg) とキシラジン (24 mg/kg) の混合麻酔薬によって麻酔された。手術中、動物の麻酔状態を維持するために、同混合麻酔薬を 1 時間毎に、初回の半量ずつ投与した。その後の大脳皮質の活動を記録している間は、麻酔状態をより良く制御するために 30 分毎に初回の 1/4 量ずつ投与した。動物の麻酔の状態は、動物の下肢の指先をピンセットで抓っても反応が見られないことで確認された。麻酔投与後、手術を開始する前に動物の外耳道や鼓膜に異常が見られないことを確認した。膜電位感受性色素を用いた光計測では、光信号が呼吸に起因する皮質表面の動きに強く影響を受けるため、記録中に動物の呼吸を一時的に停止させる必要がある。そこで、動物の気管を切開した後にカニューレを挿入し、記録中は人工呼吸を行った。人工呼吸は 1.0~1.2 秒の周期で行った。気管切開後、気管からの分泌物を抑えるために気管やカニューレ表面にはエピネフリンを塗布した。更に、同分泌物を抑えるために、初回麻酔後に硫酸アトロピン (0.2

mg/kg) を一回、背側部の皮下に注射した。手術中に気管からの分泌物が見られたときには、カニューレに細管を挿入し、分泌物の吸引を行った。記録の間、動物の自立呼吸を止め人工呼吸を行うために、臭化パンクロニウム (0.2 mg/animal) を背側部の皮下に注射し、動物を不動化した。記録は 1 匹の動物に対して約 2 時間程度行われたが、その期間、上の臭化パンクロニウムによる不動化は維持されていた。動物の直腸体温は動物下のヒートパッドにより 35.5 °C または 38.0 °C に維持された。実験の間、動物の状態を確認するために心拍を常時モニターした (~3 Hz)。脳浮腫を抑えるため、頭骨除去を開始する前にデキサメサゾン (0.5 mg/kg) を動物の下肢に筋肉注射した。左半球の大脳皮質聴覚野上にある頭骨を、縫合線を目印にして吻尾側方向に~12 mm、背腹側方向に~10 mm 除去した。その後、皮質上の硬膜を顕微鏡下で慎重に除去した。硬膜が除去され暴露された皮質に対して、膜電位感受性色素 RH-795 (0.7 mg/ml in saline) による染色を行った。染色は 45 分、2 回行われた。染色中の脳表の乾燥や、染色液の他の皮質表面への流出を抑えるため、染色液を染みこませた清浄綿布で皮質表面を覆った。

## 6.2 光計測

電位感受性の蛍光色素は、色素が結合した膜の膜内外の電位差に比例して蛍光量が変化する ([Cohen et al. 1978](#))。その蛍光量は、細胞に結合している蛍光色素の数 (染色密度) に比例するため、その蛍光変化量は基底蛍光量によって除算されることにより正規化される ([Cohen et al. 1978](#); 図 1)。本研究では、高い時間分解能をもった CMOS 撮像装置 (最短サンプリング周期 0.1 ms; MiCAM Ultima, BrainVision, Tokyo, Japan) を用いて、膜電位感受性色素で染色した大脳皮質表面からの光信号を 1 ms のサンプリング周期で記録した。膜電位感受性色素 RH-795 の蛍光波長がヘモグロビンの吸収波長と近く、記録される光信号が呼吸や心拍に起因する皮質表面の動きのみならず血流にも影響を受けるため、図 2 の概要図で示す手法により、呼吸器の制御及び同期、2 値化された ECG (= R 波) との同期を行った上で計測を行った。更に、光信号の中に含まれる音刺激によって惹起された活動と相関する信号を抽出するために、刺激を提示する条件と刺激を提示しない条件の二つの条件で記録した信号の差分を行った。領野区分に必要な空間解像度を得るために、総合倍率 1.6 倍の対物・集光レンズが用いられ、 $6.25 \times 6.25 \text{ mm}^2$  の計測視野で大脳皮質聴覚野の活動が記録された。計測は、モルモット聴覚皮質においてコア領域にあたる AI、DC の二つの領野を中心とした二つの計測視野で行われた。

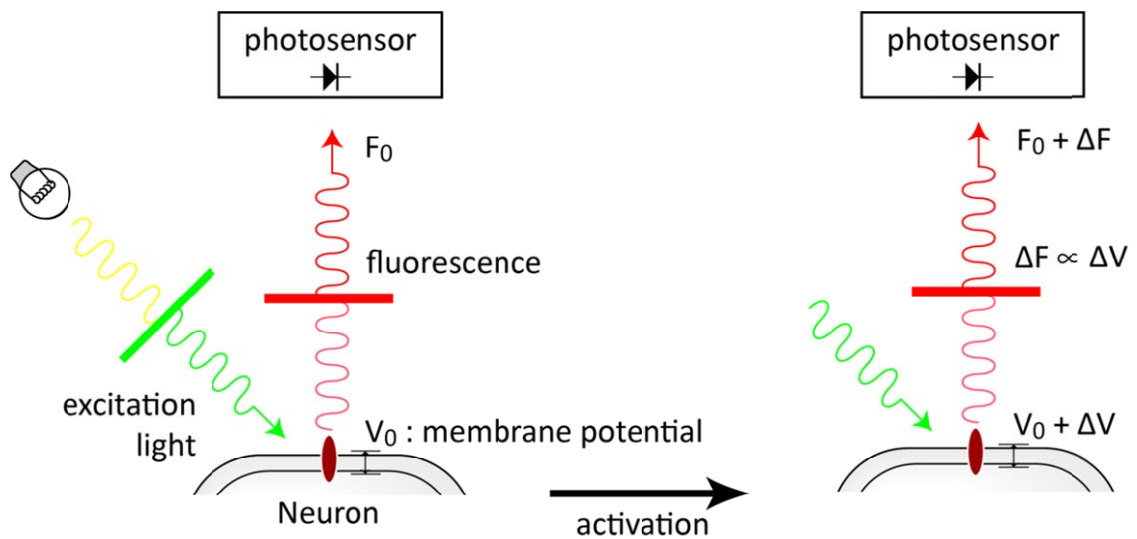


図 1. 膜電位感受性の蛍光色素を用いた光計測の原理図。蛍光色素から得られる基底蛍光量は  $F_0$ 、蛍光量変化は  $\Delta F$  と記されている。観測している細胞の膜電位  $V_0$  は細胞の活動によって  $V_0 + \Delta V$  に変化するが、 $\Delta F$  と  $\Delta V$  が比例しているため、それぞれの細胞の膜電位変化を知ることができる。一般的に、細胞の膜に結合している蛍光色素の数は個々の細胞で等しいとは限らないため、 $\Delta F$  を  $F_0$  で除算することにより、その結合数の差による蛍光量の差を補正(正規化)する。





### 6.3 音刺激

全ての音波形は、独自に作成した計算機ソフトウェアによって合成され、音刺激装置である TDT real-time processor (RX6, Tucker-Davis Technologies, FL, US) のメモリ上に展開された。合成された音の出力には、広い周波数帯域 ( $> 100$  Hz,  $< 40$  kHz) を有するイヤフォン (ATH-C602, Audio-Technica, Tokyo, Japan) が用いられ、そのイヤフォンは TDT headphone buffer (HB7) によって駆動された。イヤフォンの音を動物の外耳道入り口付近に限局させるため、イヤフォンにはトレルチェ式の耳鏡が取り付けられた。AI、DC とそれらの周辺領野の同定後、背尾側方向の聴覚皮質と視覚皮質の境界を同定するために、広帯域雑音 (100 - 32,000 Hz) が同イヤフォンから提示された。提示音の音圧 (sound pressure level; SPL) は B&K 2610 増幅器、2669 前置増幅器、そして 4191 コンデンサマイクロフォン (Brüel & Kjær, Nærum, Denmark) によって測定され、刺激時には 50~70 dB SPL (0 dB SPL は 20  $\mu$ Pa) の音が動物の右耳 (= 記録される聴覚皮質の反対側の耳) に提示された。音の始まりや終わりでの音の歪みを抑制するために、音の立ち上がり立ち下がりそれぞれ 10 ms で、余弦曲線により連続的に変化させた。音の持続時間は全ての実験に置いて 50 ms とした。記録は 2 重壁の防音室内で行われた ([Nishimura et al. 2006](#))。

## 6.4 データ解析

CMOS 撮像装置によって収集されたデータは、著者らが独自に開発した光計測解析ソフトウェアによって視覚化及び定量化された。具体的な解析手法を以下に記す。6.2 に記されている通り、正規化された蛍光量変化 ( $\Delta F/F_0$ ) を記録された生の光信号から計算する必要があるが、 $\Delta F/F_0$  には光信号に含まれるノイズに起因するオフセット成分が混入している ([Nishimura et al. 2010](#))。そこで、刺激提示の 30 フレーム (= 30 ms) または 50 フレーム前の時間における信号を平均し、その平均値を  $F_0$  の推定値として、 $\Delta F/F_0$  に含まれるオフセット成分を除去した。各画素における  $\Delta F/F_0$  の計算の後、低域通過型の Gaussian-windowed Sinc フィルタで高周波雑音を除去した (< 500 Hz)。刺激提示と無刺激提示を対にした差分記録は、一つの刺激に対して 16 回行い、それらの値を平均した。計測視野における  $\Delta F/F_0$  の時空間応答様式を視覚化するため、各画素における  $\Delta F/F_0$  を色でコーディングし (図 3)、それらの色を脳表画像 (=  $F_0$  画像) 上に図中のスケールバーで示される透過率にて描画した (図 4, 図 10)。各画素における活動潜時は、 $\Delta F/F_0$  が刺激前時間における信号の標準偏差の 3 倍を超える時間と定義した。

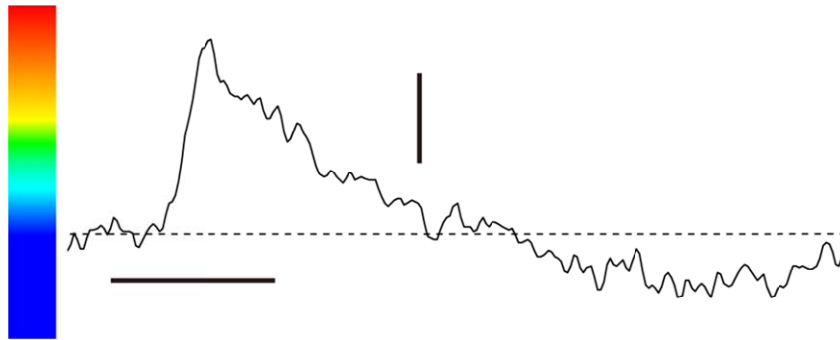


図 3. 1 画素における  $\Delta F/F_0$  の時間変化の一例とその振幅の色コーディング(正振幅強調)。各時間における振幅を横のカラーバーで示されている色と対応させ、その時間の振幅を色で表現する。典型的な興奮性入力による活動は膜電位を上昇させることから、この例では正の振幅を強調して色コーディングを行っている。水平方向のスケールバーは 50 ms、垂直方向のスケールバーは 0.5 %である。水平方向のスケールバーは音提示のタイミングやその持続時間も示している。水平に走る破線は  $\Delta F/F_0$  の零レベルを示している。

## 7 実験結果

### 7.1 AIとその周辺領野の同定

AIとその周辺領野の同定のために、18匹の動物が用いられた。AIとその周辺における大脳皮質の250 Hzから4 kHzの純音刺激に対する時空間応答様式は図4に例示される通りである。各画素における応答振幅は色コーディングし、脳表面像に重ね合わされた。著者らのグループによる以前の報告 ([Fukunishi et al. 1992](#); [Song et al. 2006](#)) にあるように、皮質の純音刺激に対する応答は全ての場所において同時に現れることはなく、多くの場合、モルモットの偽シルビウス溝 (図4 a1-e1中の白い点線部)の尾側側に位置するAI内の背側部よりの場所から活動が始まった。そして活動は背尾側方向へ広がった (図4; [Song et al. 2006](#))。AIおよびDCにおける最短の活動潜時を調べたところ、AIでは $25.6 \pm 3.8$  ms ( $n = 17$ ; mean  $\pm$  SD)、DCではAIに若干遅れて $26.0 \pm 3.5$  ms ( $n = 11$ ; mean  $\pm$  SD)であった。AIとDCの位置、大きさ、そしてそれら領野のトノトピー構造を確認するため、AIの最短潜時から7 ms後 (= 刺激のオンセットから約33 ms後)の、それぞれの純音刺激に対する皮質の応答を、計測視野における応答の最大振幅の25%を閾値として2値化し、それぞれの応答を重ねあわせた (図5)。純音の周波数が上がるにつれて、AIにおいては吻側から尾側への活動領域

の明瞭な変遷が見られ、DC においてはその逆向きの変遷が見られた。AI と DC の上記トノピー構造は実験に用いたすべての動物において一貫して見られ、それらの短潜時応答やトノピー勾配の向きは微小電極を用いた先行研究 ([Redies et al. 1989](#); [Wallace et al. 1999](#); [Wallace et al. 2000](#)) における報告とよく合致していた。本研究において同定された AI は背腹方向に 4~5 mm、吻尾側方向に 5 mm 程度であった (図 9)。

刺激のオンセットから 33 ms を過ぎると、AI で現れた活動は更に背腹方向に広がって、皮質の腹側淵近傍まで達した。各画素における最大の応答振幅を調べたところ、AI とその淵の間に、急峻な振幅の変化を示す点と、その集合である線の存在が明らかになった (図 7)。上の急峻な振幅の変化を示す点は AI と腹側に隣接する別の領域の境界であると仮定し、その領域を腹吻側領野 (ventrorostral field; VR) と名付けた。VR の背腹方向の大きさ (~1.5 mm; 図 9) やその位置は、[Wallace ら \(2000\)](#) の報告にある AI の腹側に隣接する腹吻側ベルト (ventrorostal belt; VRB) の吻側部とよく合致していた (図 21)。

VR での活動が現れてまもなく、計測視野の腹尾側部において二つの孤立した活動部位 (図 4 二重矢尻) が現れた。腹側に位置する活動領域 (図 4 黒の二重矢尻) は刺激に用いられた純音の周波数が上がるにつれて、その応答が尾側から腹側に変遷していった。この領域を腹尾側領野 (ventrocaudal field; VC) と名付けた。

一方で、尾側に位置する活動領域 (図 4 白の二重矢尻) は周波数が上がるにつれて、その応答が腹側から背側に変遷していった。この領域は AI と DC の中間に位置していたので、[Wallace ら \(2000\)](#) の定義にならい、中間領野 (intermediate zone; T) と名付けた。トノトピーを有するこれらの領野を定量的に評価するために、VC における最短の活動潜時から 14 ms 後の、それぞれの純音刺激に対する皮質の応答を図 5 と同様の手法で 2 値化した (図 6)。2 値化のための閾値には、計測視野における応答の最大振幅の 50% が用いられた。図 4 で示されている動物と異なる動物においても、VC および T における同様のトノトピーが見られた (図 6)。

実験に用いられた 18 匹中 9 匹で、斑点状の小さい応答 (背腹方向に 1 mm 未満) が AI の吻側で見られた (図 4 e4 二重矢印)。(残りの 9 匹のうち 6 匹では、計測視野の中にその応答領域が入っていなかった。更に残りの 3 匹では、期待される場所にその応答が見られなかった。)この領域を吻側小領野 (rostral small field; R) と名付けた。R は刺激に用いられた純音の周波数が 2 kHz 以上のときに孤立した活動が確認できたが、その領域は AI の低い周波数の純音に対する応答領域の中に含まれていた。図 8 に R のトノトピーを示す。R は AI とは異なり、トノトピーの周波数勾配が尾側から吻側へ向かっていた (図 5 vs. 図 8)。

これらの同定された複数の領野の位置やトノトピー構造、その応答領域がどの程度ばらついているかを示すため、各動物において、各刺激に対する応答の輪郭

線を抽出し、それらを重ねあわせた (図 9 A)。応答の輪郭線は、純音で惹起された皮膚の活動を図 5 と図 6 で用いられた基準で閾値処理したものをを用いて定められた。応答輪郭線の形は動物の間で若干異なっているが、それぞれの領野(AI, DC, VR そして VC) の相対的な位置は一定していた。この結果をまとめたものが図 9 B である。VR と VC は鏡像対称なトノピー構造を有している。VC は本研究にて新規に同定された領野である (図 9 B, 灰色で塗られた領域)。VR および VC の背腹方向の長さは約 1.5 mm、T は約 1.4 mm であった。VR の吻尾方向の長さは約 3 mm、VC および T は約 1 mm であった。



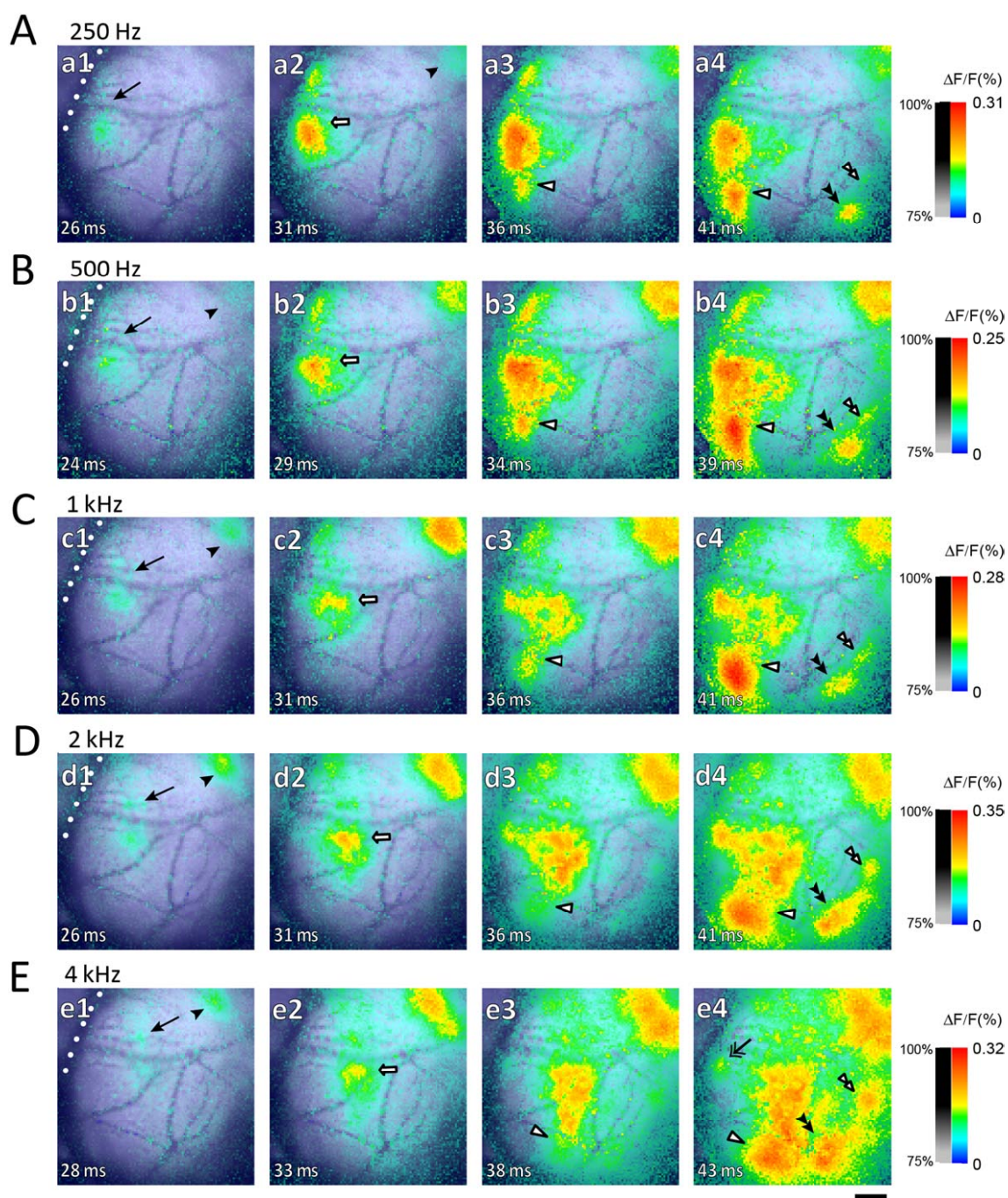


図 4. AI およびその周辺領野における、60 dB SPL の純音によって惹起された活動の時空間応答様式。刺激に用いられた純音の周波数は 250 Hz (A の図) から 4 kHz (E の図) である。それぞれの図は、各図の左下にある刺激のオンセットからの時間での空間的な応答を示している。各画素における応答の振幅は各図の右にあるカラーバーによって色コーディングされている。その応答は、カラーバーの隣にあるグレースケールバーで定義される不透過率を用いて、脳表面画像 (=  $F_0$  画像) の上に重ね合わされた。各図の上方向が背側方向、右方向が尾側方向である。a1 から e1 の中にある黒い矢印は AI、黒い矢尻は DC において最も早い応答部位をそれぞれ



れ指し示している。a2 から e2 の中にある白い矢印は AI 内の腹側部にて吻尾側方向に広がる応答を指し示している。a3 から e3 および a4 から e4 の中にある白い矢印は腹吻側領野 (ventrorostral field; VR) の応答を指し示している。a4 から e4 の中にある黒い二重矢印は腹尾側領野 (ventrocaudal field; VC) の応答を指し示し、白い二重矢印は中間領野 (intermediate zone; T) の応答を指し示している。e4 の中にある二重矢印は吻側小領野 (rostral small field; R) の応答を指し示している。A から E の結果は同じ動物から得られた結果である。スケールバーは 1 mm。

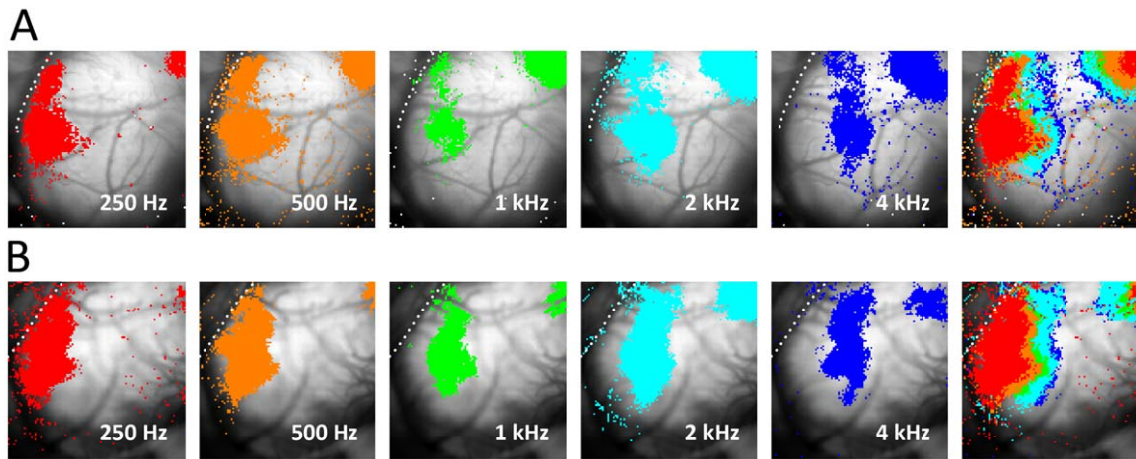


図 5. 刺激後、比較的早い時間 (AI における最短の活動潜時から 7 ms 後) で 2 値化された 250 Hz から 4 kHz の各純音刺激に対する聴覚皮質の応答。A: 各図の下に記されている周波数の純音刺激に対する応答領域が暖色(赤)から寒色(青)の色で示されている。2 値化のための閾値として、計測視野における応答の最大振幅の 25 %を用いた。最も右にある図は 250 Hz から 4 kHz の左図を順に重ねあわせたものである。B: A とは異なる動物における応答が A と同様の形式で示されている。スケールバーは 1 mm で、A と B に適用される。

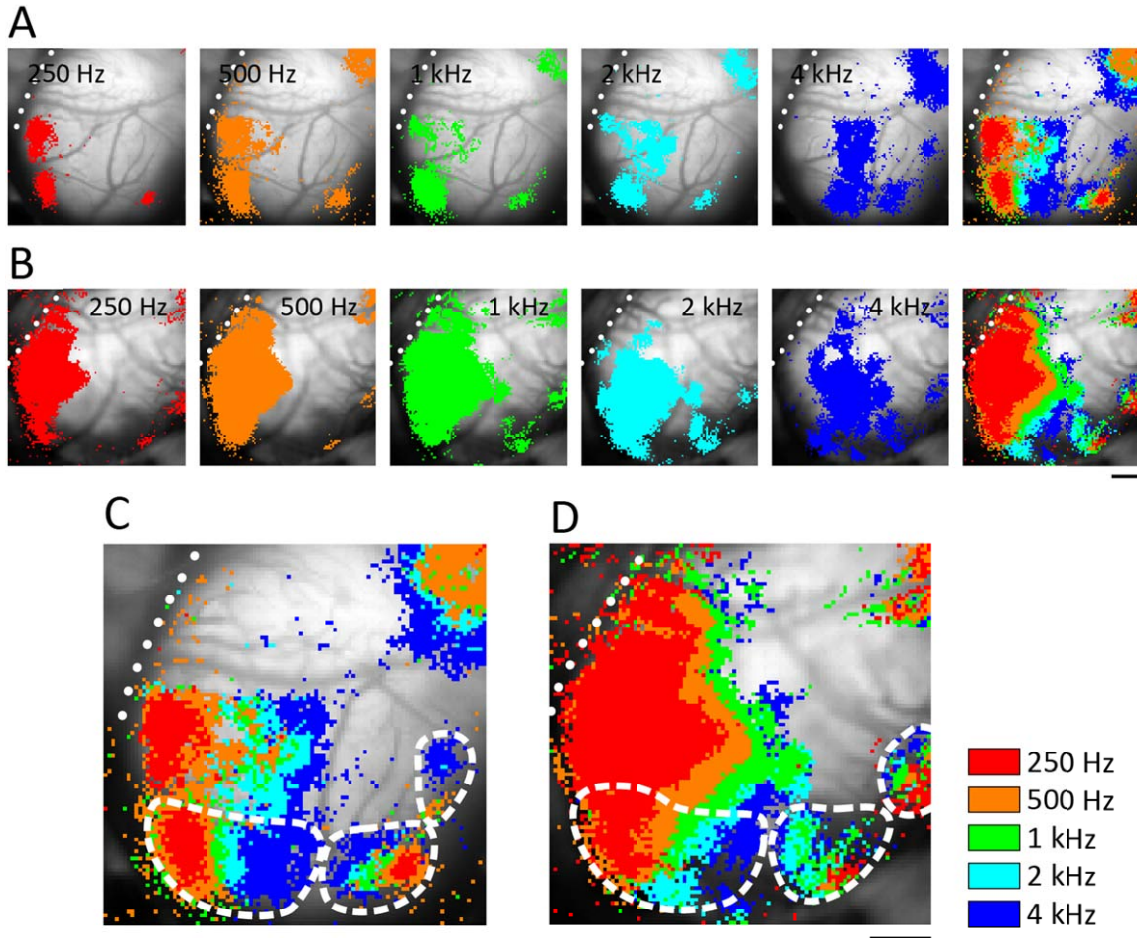


図 6. 刺激後、比較的遅い時間 (VC における最短の活動潜時から 14 ms 後) で 2 値化された 250 Hz から 4 kHz の各純音刺激に対する聴覚皮質の応答。A: 図 4 で示されている動物から得られた各図の下に記されている周波数の純音刺激に対する応答領域が暖色(赤)から寒色(青)の色で示されている。2 値化のための閾値として、計測視野における応答の最大振幅の 50 % を用いた。最も右にある図は 250 Hz から 4 kHz の左図を順に重ねあわせたものである。B: A とは異なる動物における応答が A と同様の形式で示されている。C と D: スポット状に現れるトノトピー構造をもった二つの領域。白い破線は、2 値化された応答を元に判断されたそれら領域の範囲を表している。そのうちの腹側(図の下側)に位置する領域が VC。C は A と同じ動物、D は B と同じ動物である。全てのスケールバーは 1 mm。D のスケールバーは C に、B のスケールバーは A にも適用される。

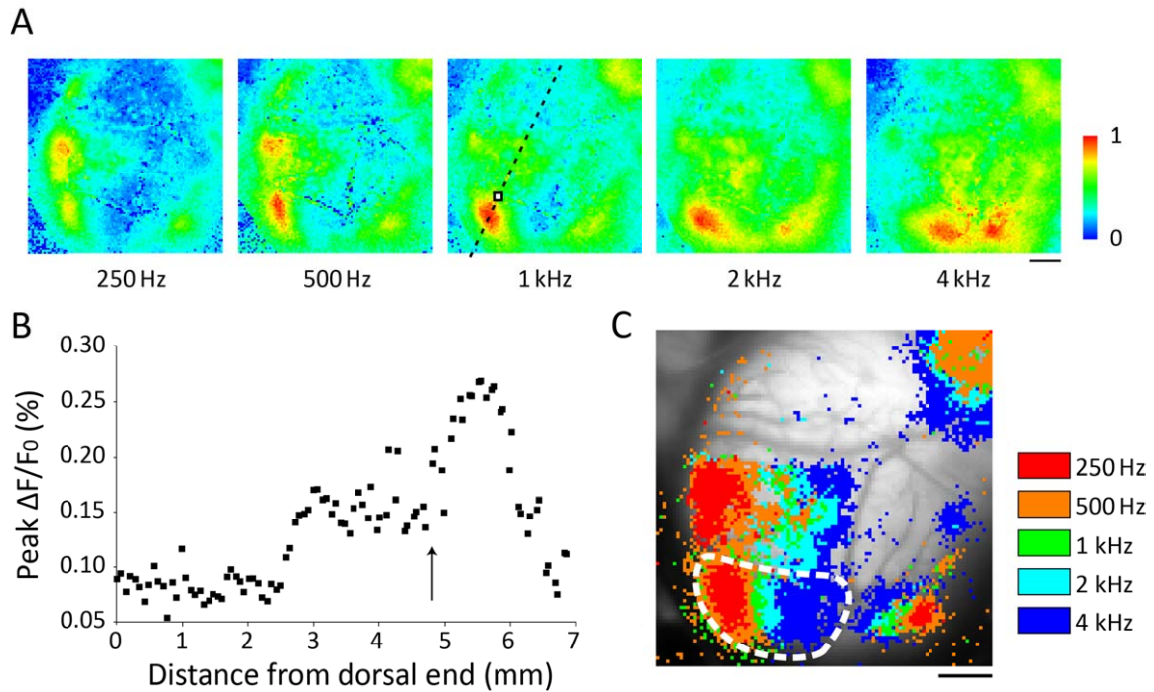


図 7. AI とその腹側に隣接する領野 (ventrorostral field; VR) の境界。A: 各画素における最大振幅を計測視野における最大値で正規化し、最も右にあるカラースケールを用いて色コーディングしたもの。各刺激周波数において、腹吻側部(図の左下)で特徴的な応答振幅が強い領域(赤い領域)が現れている。1 kHz の結果の中に描かれている黒い破線や白い四角については B の説明で後述する。B: A に描かれている黒い破線上の各画素における最大振幅を縦軸、その線における背側終端からの距離を横軸にして、最大振幅の線プロフィールを示したもの。矢印はその最大応答振幅が急峻に上昇し始める位置(A の白い四角と対応する)を指し示している。C: 図 6C と同じものに VR の範囲を示したもの。B と同様の手法で定めた点を複数調べ、それぞれをつないで線にし、それを AI と VR の境界と定めた(白い破線)。AI と VR の境界以外の線は、図 6A で示した応答領域を元に定めた。全てのスケールバーは 1 mm。



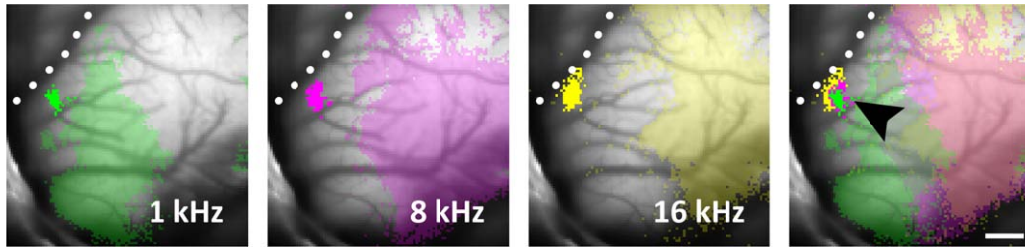


図 8. 吻側小領域 (rostral small field; R) の応答とそのトノトピー。R における最短の活動潜時から 10 ms 後の皮質の活動を計測視野における最大応答振幅の 25 %の閾値で 2 値化した。刺激に用いられた純音周波数は各図の右下に記してある。最も右にある図は、それら 3 つの応答を重ねあわせたものである。R 以外の領域の閾値上応答は同じ色で透過的に描かれている。R の応答は黒い矢尻で指し示されている。スケールバーは 1 mm。

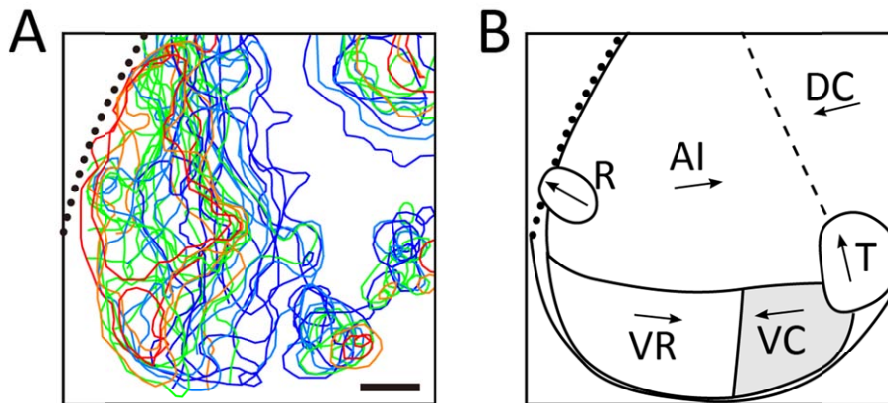


図 9. 複数の動物におけるトノトピー構造の不変性と各領域の応答部位。A: 8 匹の動物の応答輪郭線を重ねあわせたもの。応答輪郭線は純音で惹起された領域で、図 5 と図 6 で用いられた基準で閾値処理されたものを用いて定めた。250 Hz (赤), 500 Hz (橙), 1 kHz (緑), 2 kHz (水) そして 4 kHz (青) の純音刺激に対する応答がこの解析に用いられた。いくつかの動物では、全ての純音周波数に対する応答が記録されていない。この重ねあわせのために、代表的な一匹の動物の応答輪郭線を基準とし、AI と DC の輪郭線が合致するように残り 7 匹の動物の応答輪郭線を重ね合わせた。スケールバーは 1 mm で、B にも適用される。B: AI とその周辺で同定された領域の概要図。本研究において新規に同定された VC は灰色で塗られている。各領域の中に描かれている矢印は、その領域のトノトピーの周波数軸の向きを表している。A と B にある黒い点線は偽シルビウス溝を記している。

## 7.2 DCとその周辺領野の同定

DCとその周辺領野の同定のために、9匹の動物が用いられた。DCとその周辺における大脳皮質の250 Hzから24 kHzの純音刺激、および広帯域雑音に対する時空間応答様式は図10に例示される通りである。各刺激に対する応答のDCにおける最短の活動潜時を基準の時間（図10の例では15 msから22 msの間）とし、それから4 ms毎の皮質の応答を色コーディングした（図10）。DCおよびDCの周辺の領野の応答は、AIおよびAI周辺の領野の応答（図4）と比べると、その振幅により領野の同定を行うことが容易ではなかったため、ここでは活動潜時に注目して領野同定のための解析を行った。

まず、聴覚皮質の中で短潜時であることが期待されるDC ([Wallace et al. 2000](#)) を定位し、DCとDC尾側に位置するベルト領域との境界を同定するため、刺激前時間の信号の標準偏差の3倍を基準にして、各画素における活動潜時を調べた。その活動潜時の計測視野における空間分布を調べたところ、他の領域に比べて短い潜時をもつ領域が一つないし二つ見出された（図11 A）。DCはトノトピーを有していて、その勾配は尾側から吻側に向かっていることが期待される ([Wallace et al. 2000](#)) ので、250 Hz、1 kHz、2 kHzの各純音刺激に対する応答より、そのトノトピー勾配を有する短潜時応答領域を抽出した（図11 A、黒い破線）。それらの抽出された領域の輪郭

を連続的な線で結んだものが、図 11 の B (黒い破線) である。この線が DC と DC 尾側に位置するベルト領域との境界線になっていることを確認するため、ベルト領域がよく応答する広帯域雑音 ([Wallace et al. 2000](#)) を用いて、計測視野の各画素における最大の応答振幅を各動物において調べた (図 11 C)。その最大応答振幅の空間分布上で定めた境界線を重ね合わせると、境界線の外側 (放射方向) では、DC に比べ強い応答が見られ、応答振幅が変化する淵とその境界線が各動物においてよく一致していた (図 11 C)。

次に、DC 尾側に位置するベルト領域を詳しく調べるため、その領域における最短の活動潜時、そしてその 6 ms 後の間の活動潜時を有する応答を抽出し、それらの空間分布を調べた (図 12 A)。調べた 9 匹中 9 匹において、DC 尾側に位置するベルト領域に一つ以上の孤立した活動潜時の短い領域が見られた。それらの短潜時応答領域を抽出し、重ねあわせたものが図 12 B である。(なお、DC 腹側に見られる孤立した活動潜時の短い領域は、のちの解析により示される AI と DC 境界の腹側に位置している T 領野である。) 明瞭に二つの領域が見られたものは 9 匹中 1 匹であった (図 11 A と B; GP #1)。他の動物では二つの領域が融合したように見られる (図 11 A と B; GP #2) か、ひとつの領域しか見られなかった (図 11 A と B; GP #3)。9 匹中 9 匹で見られた DC 尾側に位置するトノトピーを有する領域を、[Horikawa ら \(2001\)](#) の領野区分

にならい、後側領野 (posterior field; P) と名付けた。図 11 B の示すように、P においては、そのトノトピー勾配が尾側から吻側に向かっていた。

強い聴性応答を示す領域は皮質上にある程度限局している (図 10 A)。その聴性応答を示す範囲を定量的に定めるために、70 dB SPL の広帯域雑音を用いて DC 周辺における聴性応答を記録した (図 10 B)。応答領域の定量化のために以下の基準が用いられた。刺激前時間における信号の標準偏差の 5 倍を超え、かつ、計測視野における最大の応答振幅の 1/3 を超える応答を、強い聴性応答を示している応答とした (図 13)。その応答範囲の輪郭は、背吻側方向では偽シルビウス溝、背尾側方向では lateral groove ([Spatz et al., 1991](#)) とよく一致していた (図 13)。

AI と DC のトノトピー構造は鏡像対称の関係にあり、それらの境界は、微小電極によって測られた特徴周波数が折り返す点によって定義されていた ([Wallace et al., 2000](#))。本研究においては、250 Hz から 24 kHz の純音に対する各々の応答を閾値処理し (図 14A)、それらを重ねあわせた 2 次元画像から AI と DC の境界を同定することを試みた (図 14B)。この解析では比較的明瞭なトノトピー的な応答を示す領域の折り返し線が見られたが、その境界線の精度は 400  $\mu\text{m}$  程度であった (図 14 B)。図 14 に例示されている動物においては、[Wallace ら \(2000\)](#) の領野区分にある DCB と VCB に当たる領域 (図 15) においては、周波数依存的な応答領域の変化は見られず、トノトピーがあるとは言えなかった (図 14 B)。



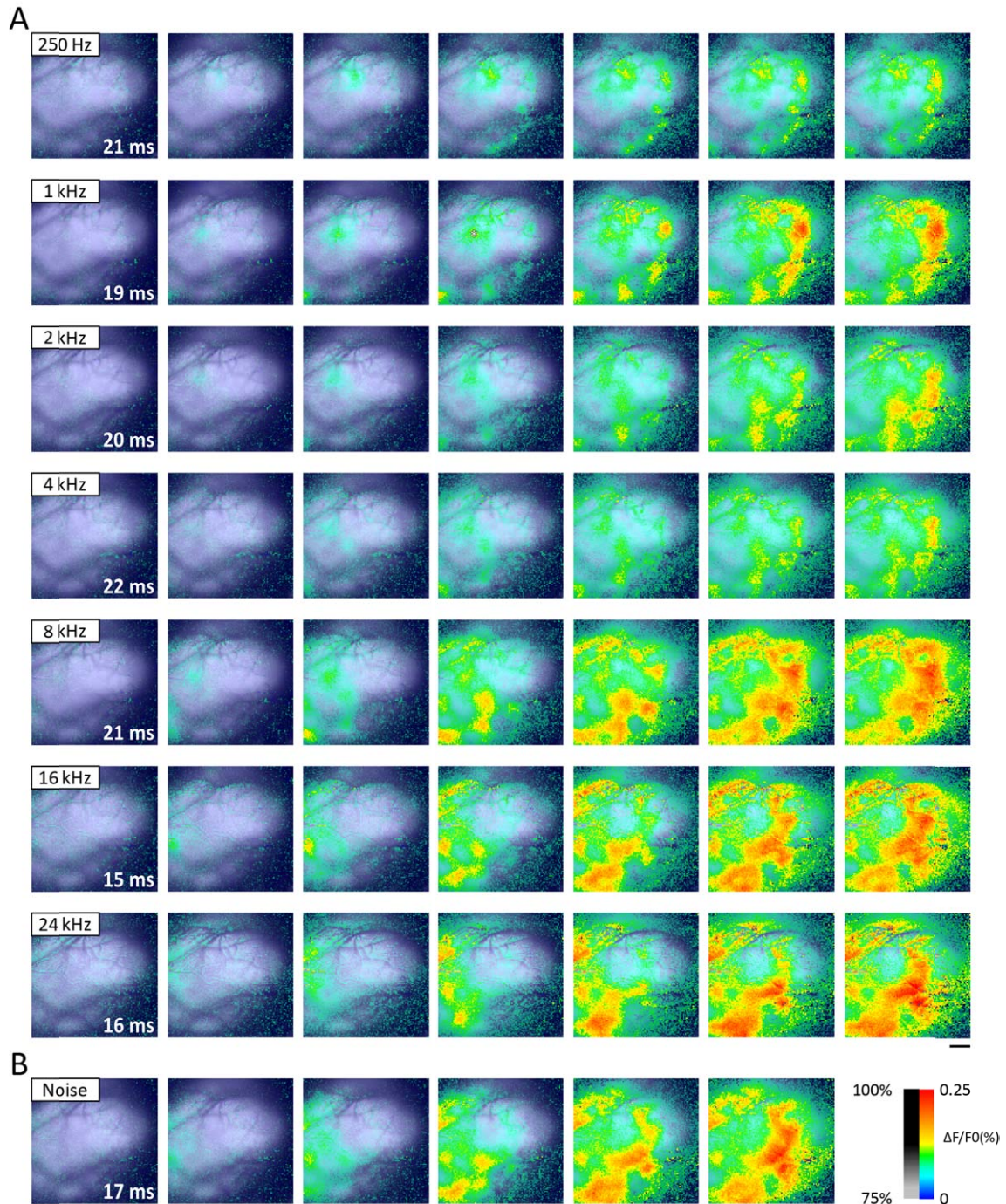


図 10. DC とその周辺領野を中心とした計測視野における、各刺激音に対する皮質の活動。A: 最も左にある各図の左上に記されている周波数の純音刺激で惹起された DC とその周辺領野における時空間応答様式。刺激に用いられた純音の周波数は 250 Hz から 24 kHz である。各図の右下に記されている時間は刺激のオンセットからの時間である。右方向に最も左の図の時間から 4 ms 毎の応答を示した。図 4 と同様に、応答振幅は B で示されているスケールによって色コーディングされている。スケールバーは 1 mm で、B にも適用される。B: 広帯域雑音で惹起されたそれら領野における時空間応答様式。A と同様に、4 ms 毎の応答が示されている。



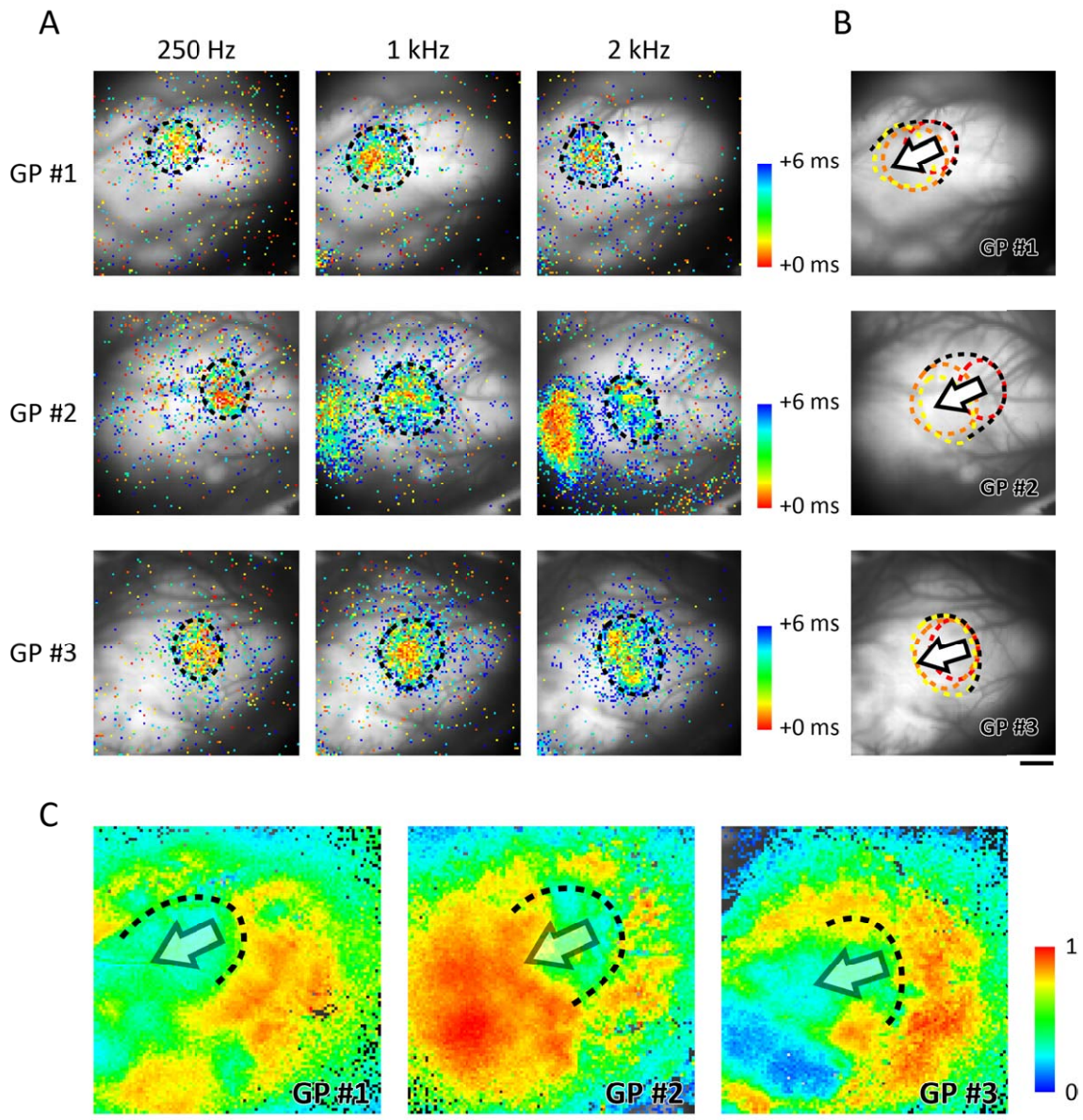


図 11. DC の同定と DC 尾側に隣接しているベルト領域との境界の同定。A: 計測視野における短潜時応答の 2 次元分布。各図の黒い破線は、各純音 (250 Hz, 1 kHz, 2 kHz) に応答した DC における短潜時応答領域を示している。DC における最短の活動潜時から 6 ms 後の間の活動潜時を有する応答のみが右のカラーバーで示される色で色コーディングし、それを脳表面像に重ね合わせた。GP #1~3 は動物の個体番号である。B: A で示した各純音での短潜時応答領域を赤 (250 Hz), 橙 (1 kHz), 黄 (2 kHz) で示し、それらを重ねあわせたもの。黒い破線は、それらの輪郭から仮に定められた DC と DC と尾側に位置するベルト領域との境界線である。白抜き矢印は DC のトノピー勾配の向きを表している。C: 計測視野の各画素における広帯域雑音に対する応答の最大振幅を、視野全体での最大値で正規化し、右で示されているカラーバーで色コーディングしたもの。黒い破線および矢印は、B で仮に定められた境界線と DC のトノピー勾配の向きである。スケールバーは 1 mm。

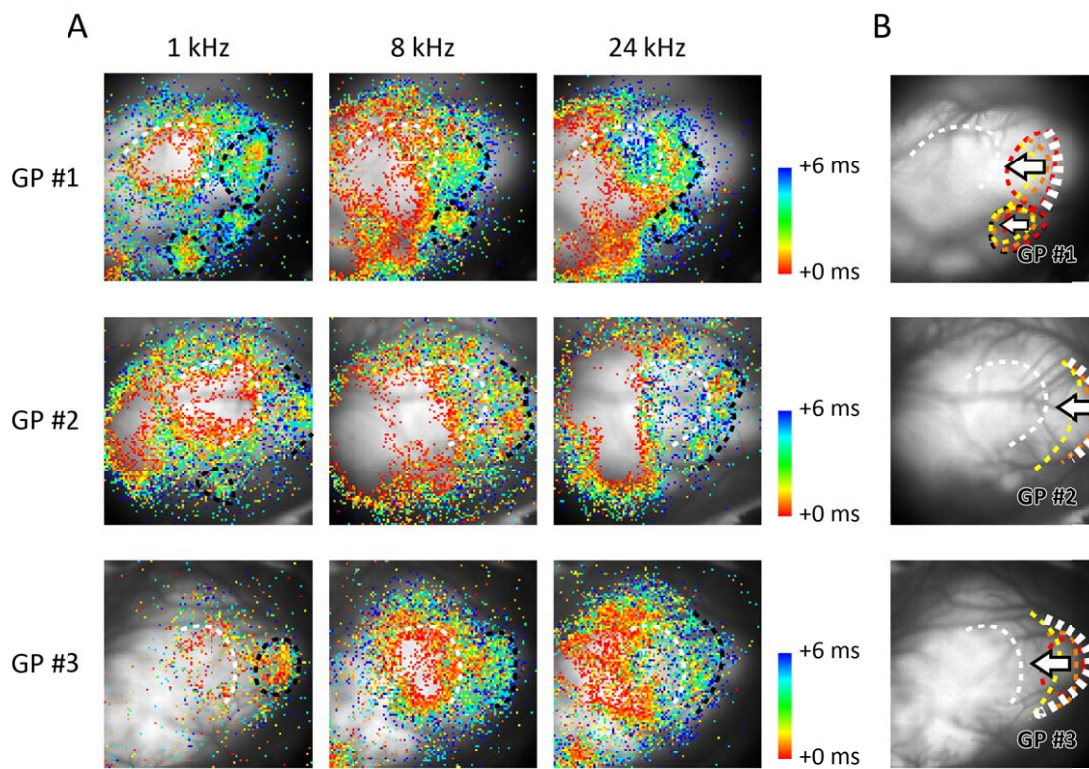


図 12. DC 尾側に隣接しているベルト領域内に存在する領野群。A: 計測視野における短潜時応答の 2 次元分布。後側領野 (posterior field; P) における最短の活動潜時から 6 ms 後までの活動潜時を有する点を色コーディングし、皮質表面の画像に重ねあわせたもの。各図の白い破線は、図 11 の DC における短潜時応答領域である。動物の個体番号は図 11 と共通している。各図の黒い破線は各純音 (1 kHz, 8 kHz, 24 kHz) に応答したベルト領域内の存在する領野群の短潜時応答領域を示している。B: DC 尾側に隣接しているベルト領域内で同定されたトノトピーを有する P と、9 匹中 2 匹で見られた P 腹側に位置するもう一つの領野。白抜き矢印はトノトピー勾配の向きを表している。細く白い破線は DC とベルト領域の境界線 (図 11)。太く白い破線はそれらの輪郭から仮に定められた P 尾側の境界線である。スケールバーは 1 mm。



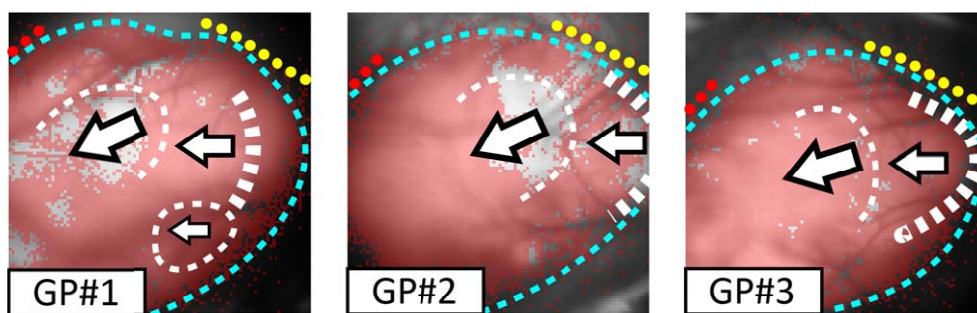


図 13. DCとその周辺領野の聴覚応答範囲。動物の個体番号は図 11、12と共通している。刺激には 70 dB SPL の広帯域雑音を用いられ、刺激前時間における信号の標準偏差の 5 倍を超え、かつ、計測視野における最大の応答振幅の 1/3 を超える画素を赤で、半透過的に脳表面画像上に描画した。水色の破線は、上の基準にて 2 値化された応答領域の範囲を示している。各図の白い破線や白抜きの矢印は、図 11、図 12 で示される境界線や各領野におけるトノピー勾配の向きを表している。赤の点線は偽シルビウス溝、黄の点線は lateral groove を示している。スケールバーは 1 mm。

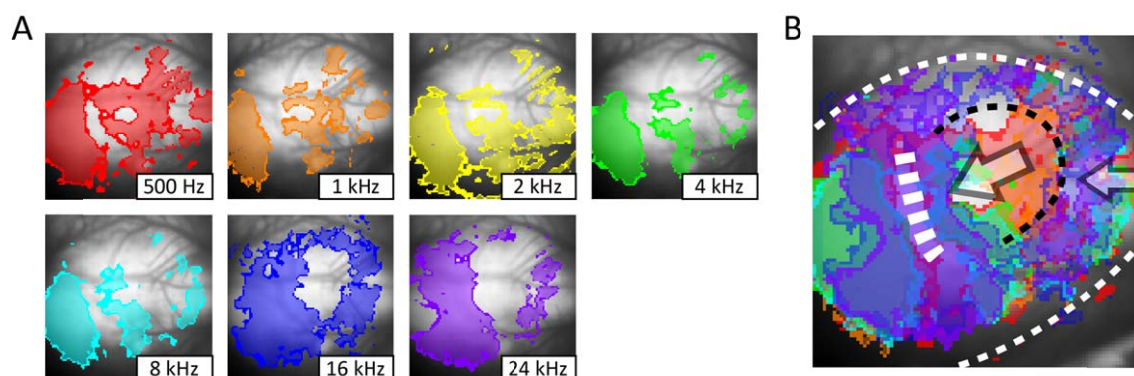


図 14. 各純音刺激に対する DC 周辺のベルト領域の応答と AI と DC の境界の定義。A: 各純音刺激 (500 Hz から 24 kHz) に対する応答を 2 値化し、色で塗り分けたもの。時間は刺激のオンセットから 45 ms。2 値化のための閾値として、計測視野における応答の最大振幅の 50% の値を用い、それを各色で脳表面画像に 50% の透過率で重ね合わせた。それぞれの応答領域で少し色が濃くなっている輪郭線 (75 % の透過率) があるが、それは計測視野における応答の最大振幅の 50% から 55% の振幅を有していた画素である。スケールバーは 1 mm。B: AI と DC の境界、P のトノピー構造、DC と DC 周辺のベルト領域との境界、そして聴覚応答領域のまとめの図。A の各図を全て脳表面画像の上に重ね合わせた。太く白い破線はその鏡像対称なトノピー構造から定めた AI と DC の境界を表している。細い白い破線は図 13 で示された聴覚応答領域を示している。黒い破線は図 11 で示された DC と DC 周辺のベルト領域との境界線である。二つの矢印は図 11, 12 で示された DC と P のトノピー勾配の向きを示している。スケールバーは 2 mm。

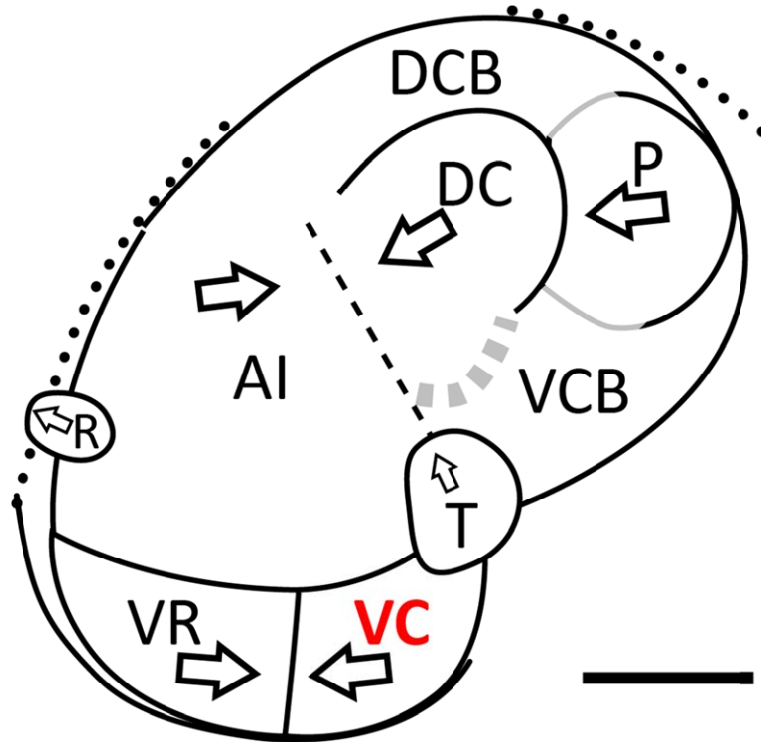


図 15. 本研究で同定された聴覚皮質各領野の概要図。各領野の名称は本文中の略語一覧を参照されたい。灰色の破線や実線は、本研究においては定量的に定めることができなかった領野間の境界である。各矢印は、本研究で確認または新しく明らかになった各領野のトノトピー勾配の向きを示している。VC は本研究において新規に同定された領野である。[Wallace ら \(2000\)](#) の報告にある DC 周辺の DCB と VCB の中間にトノトピー構造を有する P 領野の存在が確認された ([Horikawa et al. 2001](#))。 [Horikawa ら \(2001\)](#) の報告では見られなかった T 領野が本研究においては見られ、また、その領野が腹側から背側の向きへトノトピー勾配を有していることが明らかになった。小領域 R は AI に部分的に包含されていた。DCB と VCB では [Wallace ら \(2000\)](#) の報告と合致して、トノトピーが見られなかった。スケールバーは 2 mm。

### 7.3 同定された各領野における活動潜時の比較

微小電極によるユニット記録での聴覚皮質の領野区分の報告において、哺乳類のコア領域では、特徴周波数 (characteristic frequency; CF) または最適周波数 (best frequency; BF) が高いユニットでは短い活動潜時、低いユニットでは長い活動潜時を有していることが知られている ([Recanzone et al. 1999](#); [Cheung et al. 2001](#); [Imaizumi et al. 2004](#); [Philibert et al. 2005](#); [Polley et al. 2007](#))。光計測で見られる最短の活動潜時は、視床または他の領野 (下位レベルと呼ぶ) からの入力を受け、各画素が関知している細胞において膜電位が変化し始めたことを示していると考えられる。本研究においては、聴覚皮質各領野の特徴付けの一つとして、7.1 および 7.2 で同定された各領野の最短の活動潜時を調べ、下位レベルから皮質への入力の周波数依存性の有無やその様式を調べた。活動潜時は刺激音の音圧や、動物の体温によっても変化するので、解析には等音圧刺激かつ動物の直腸体温が等しいもの (38.0 °C または 35.5 °C) を使用した。刺激音として、250 Hz から 24 kHz の純音を用い、250 Hz を 1 オクターブ (Oct.) とした。刺激音の音圧には、50 dB SPL と 60 dB SPL の二つが用いられた。

### 7.3.1 AI と DC

AI における最短の活動潜時、そして DC におけるそれをそれぞれ解析した。

AI においては、24 kHz (= 7.6 Oct.) の純音刺激の結果を除いて、250 Hz から 16 kHz の間で最短の活動潜時の単調な減少が見られ (図 16, A と B)、各周波数における活動潜時の個々の平均値には有意な差は見られないものの ( $p > 0.05$ ; Mann-Whitney U test)、250 Hz (= 1 Oct.) の結果を除いて、刺激の音圧が上がると潜時の平均値は短くなった (図 16 C, 50 dB SPL vs. 60 dB SPL)。24 kHz の純音刺激で惹起された活動の潜時は、16 kHz (= 7 Oct.) のそれより有意に長かった (図 16 A,  $p < 0.05$ ; Mann-Whitney U test)。DC においては、AI と同様な単調な減少は見られず (図 17, A と B)、5 Oct. (= 4 kHz) で潜時がその平均値で、有意差はないもののその近傍の 2 kHz や 8 kHz より約 1.5 ms 長くなっていた (図 17 C 矢印; ANOVA or Kruskal-Willis test:  $p > 0.05$ )。500 Hz (= 2 Oct.) の結果を除いて、刺激の音圧が上がると潜時の平均値は短くなった (図 17 C, 50 dB SPL vs. 60 dB SPL)。AI とは異なり、24 kHz の純音刺激で惹起された活動の潜時は、16 kHz (= 7 Oct.) のそれとの有意な差は見られなかった (図 17A,  $p > 0.05$ ; Mann-Whitney U test)。

多くの記録は刺激音の音圧が 50 dB SPL であったため、最大で 12 匹の動物から、50 dB SPL の純音刺激に対する応答のうち、AI と DC の両方の最短の活動潜時

が解析可能なデータを抽出し、それぞれの対になる活動潜時を比較した (図 18)。比較のために、DC の活動潜時から AI の活動潜時を差し引き、それを潜時の差と定義した (図 18)。AI と DC の潜時の差は周波数依存的に変化し、3 Oct. (= 1 kHz) と 4 Oct. (= 2 kHz) の純音に対してはほとんど差が見られず (図 18,  $p > 0.05$ ; one sample Wilcoxon test)、5 Oct. (= 4 kHz) 以上の音に対しては、AI の潜時が DC の潜時と比べて有意に長かった (図 18,  $p < 0.05$ ; one sample Wilcoxon test)。

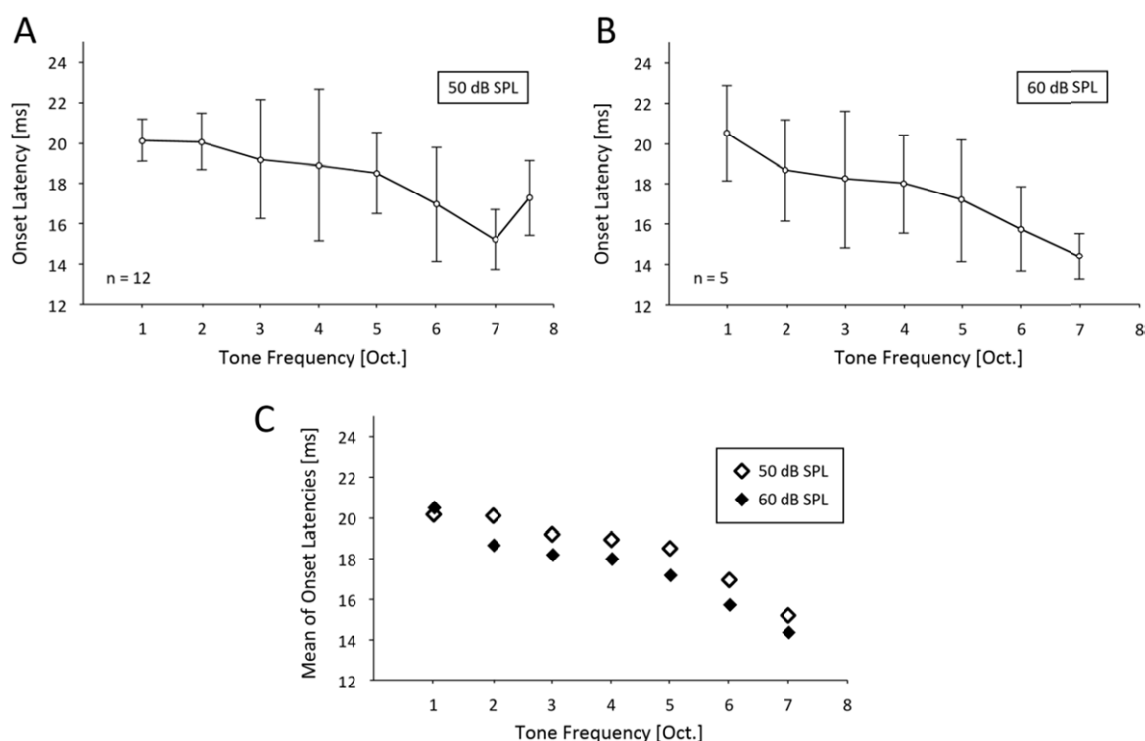


図 16. 等音圧刺激下での AI における周波数依存的な活動潜時の変化。A: 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24 kHz の各純音刺激で惹起された皮質の応答の AI における最短の活動潜時。純音の音圧は全て 50 dB SPL である。縦軸がその潜時、横軸が刺激に用いられた純音の周波数をオクターブ (Oct.) で示したものである。この場合、1 Oct. が 250 Hz である。動物数は 12 匹。A と B の白抜き丸は平均値、エラーバーは標準偏差。B: 純音の音圧が全て 60 dB SPL の条件下での A と同様の活動潜時。動物数は 5 匹。C: A と B で示されている活動潜時の平均値。250 Hz (= 1 Oct.) の純音刺激を除く刺激に対しては、高い音圧に対して短い活動潜時になっている。

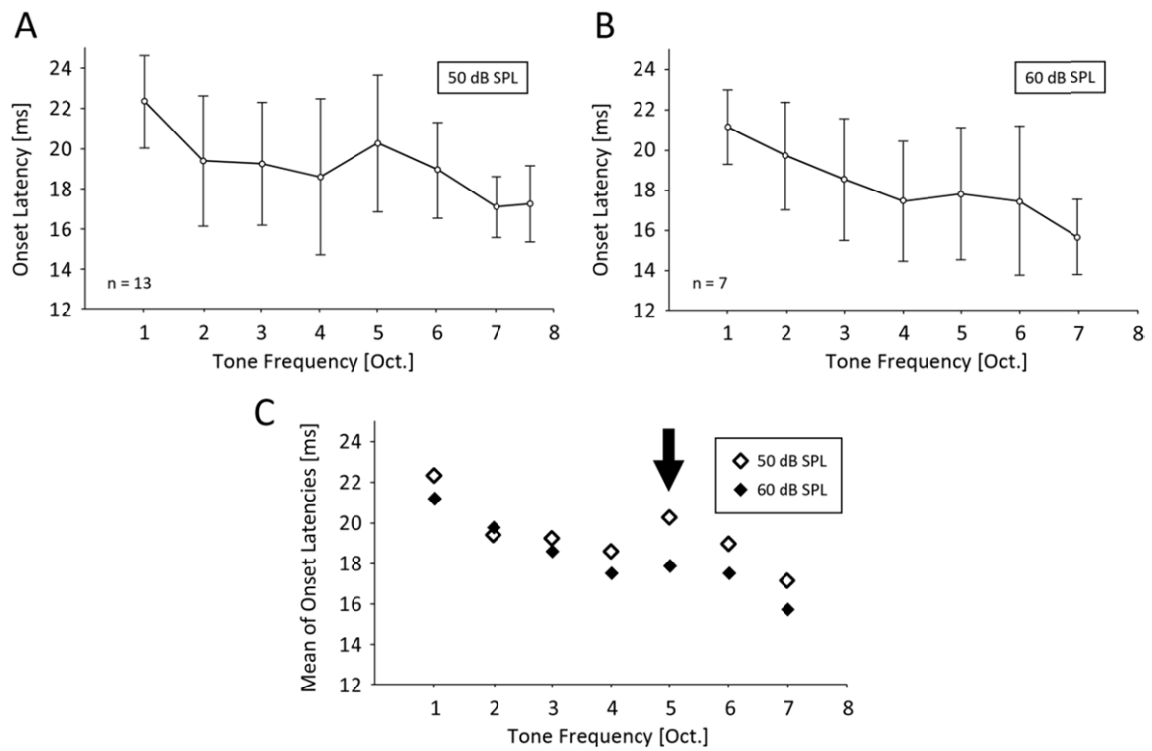


図 17. 等音圧刺激下での DC における周波数依存的な活動潜時の変化。A と B: 図 16 と同様の形式で DC における最短の活動潜時を示したもの。A では動物数が 13 匹、B では動物数が 7 匹である。エラーバーは標準偏差。C: A と B で示されている活動潜時の平均値。250 Hz (= 1 Oct.) と 500 Hz (= 2 Oct.) の純音刺激を除く刺激に対しては、高い音圧に対して短い活動潜時になっている。矢印は近傍の周波数に比べて潜時が長くなっている 5 Oct. の結果を指し示している。



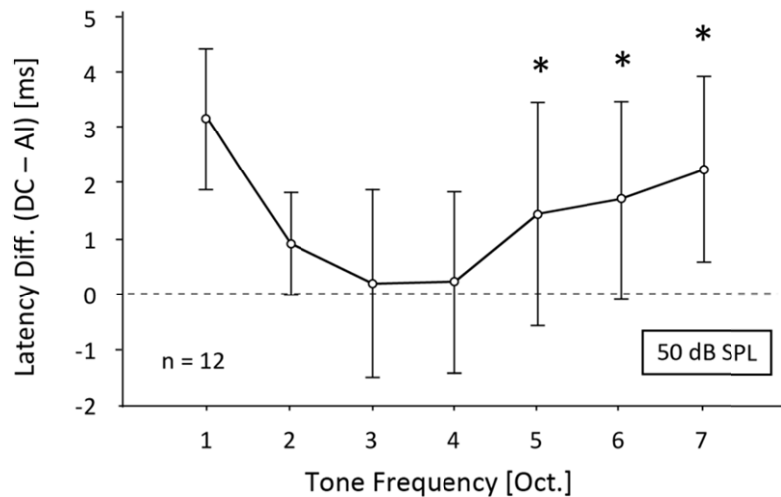


図 18. 等音圧刺激下での AI と DC における活動潜時の差とその周波数依存性。図 16 と図 17 で示されている結果のうち、AI と DC の両者の活動が記録されている結果のみを抽出し、AI と DC の活動潜時の差を調べたもの。縦軸が DC の活動潜時から AI の活動潜時を差し引いた値で、数値が正の場合には DC の活動潜時が長いことを意味する。5 Oct. (= 4 kHz) から 7 Oct. (= 16 kHz) の間で、有意に DC の活動潜時が AI の活動潜時より長い ( $p < 0.05$ ; one sample Wilcoxon test)。エラーバーは標準偏差。低い周波数 (< 3 Oct.) の純音刺激に対しては AI と DC の中のそれぞれ離れた場所で応答が見られるため、本研究で適用された光学顕微鏡の倍率( $\times 1.6$ )では同時に記録できない動物がほとんどであった (12 匹中 3 匹)。低い周波数 (< 3 Oct.) での有意な差は見られていない ( $p > 0.05$ ; one sample Wilcoxon test)。エラーバーは標準偏差。

### 7.3.2 周辺領野

7.3.1と同様に、7.1、7.2で同定された各周辺領野のうち、トノトピーを有する領野における最短の活動潜時をそれぞれの領野で解析した。これらの領野において、活動潜時の周波数依存的な特徴的变化は見られなかった(図19)。DCの腹側に隣接しているPにおいては、有意な差こそ見られないものの、DCと同様に、5 Oct.の純音に対する潜時が近傍の周波数の活動潜時より長い傾向にあった(図19D 矢印)。最短の活動潜時という一つの指標でみたときのDCとPの共通性を詳しく検討するため、最大で9匹の動物からDCとPの両方の最短の活動潜時が解析可能なデータを抽出し、それぞれの対になる活動潜時を比較した(図20A)。平均値で、PはDCに比べ概ね5 msから6 ms長い潜時を有していたが、PとDCの活動潜時の差に顕著な周波数依存的な変化は見られなかった(図20A)。その標本数よりあくまで参考データであるが、AIとPで同様の解析を行っても、顕著な周波数依存的な変化は見られなかった(図20B)。DCとP、AIとPの各領野における活動潜時の対を全データで調べたところ、Pの活動潜時とDCの活動潜時はよく相関していた(図20C;  $r = 0.89$ ; Student's t-test:  $p < 10 \times 10^{-16}$ )。また、AIに対しても同様に、Pの活動潜時とAIの活動潜時はよく相関していた(図20D;  $r = 0.87$ ; Student's t-test:  $p < 10 \times 10^{-6}$ )。

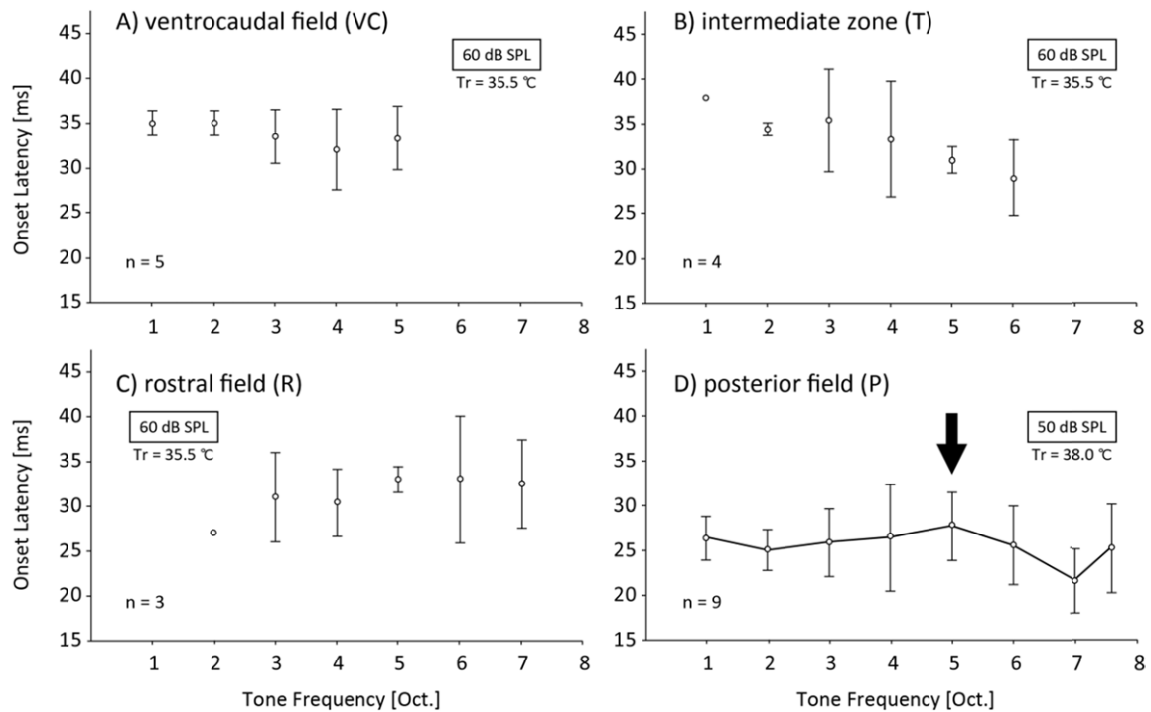


図 19. 等音圧刺激下でのトノトピー構造を有する AI および DC の周辺領野の活動潜時。A から D: 図 16, 17 の A, B と同様の形式で VC, T, R, P 各領野における最短の活動潜時を示したもの。それぞれの n は動物数を表している。A から C は動物の直腸温 (Tr) が 35.5 °C のときの VC, T, C における活動潜時、D は Tr が 38.0 °C のときの P における活動潜時である。活動潜時は体温にも依存して変化するので、D の潜時を A, B, C の潜時と直接比較することはできない。エラーバーは標準偏差。

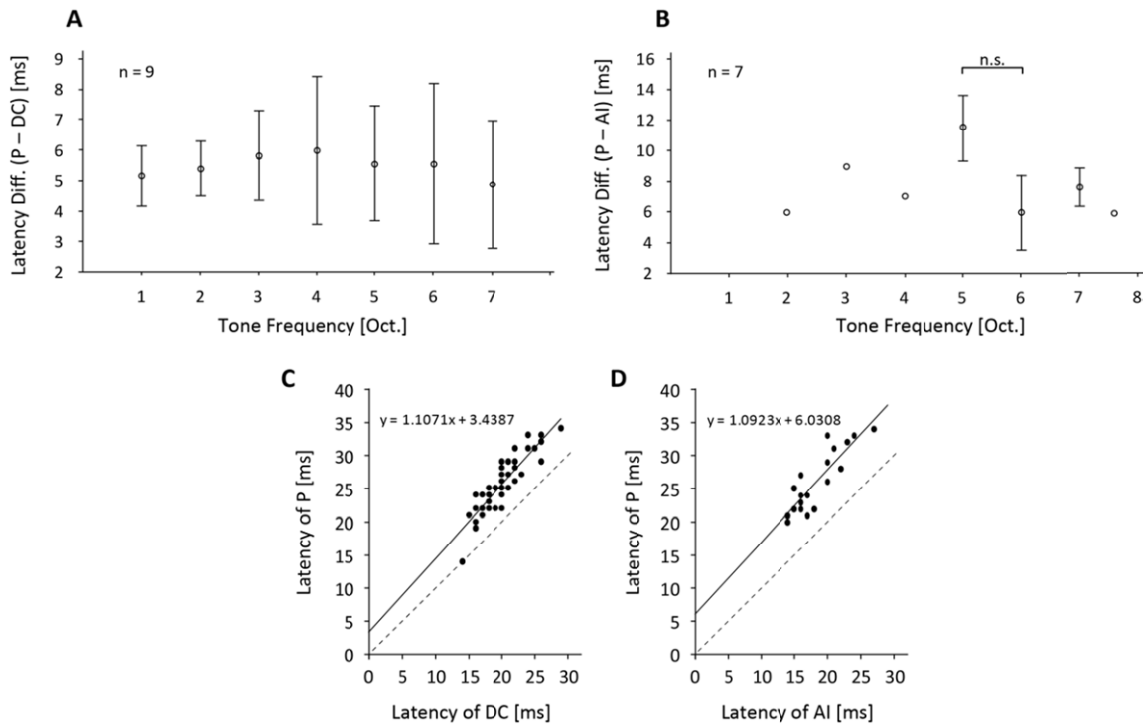


図 20. 等音圧刺激下での AI と P および DC と P における活動潜時の差とその周波数依存性。A と B: 図 18 と同様の形式でそれぞれの領野間での活動潜時の差が示されている。P の活動潜時は常に AI や DC の活動潜時より長い、周波数依存的な変化は見られなかった。AI と P は離れた場所にあるため、本研究で適用された光学顕微鏡の倍率 ( $\times 1.6$ ) では低い周波数 ( $< 5$  Oct.) の純音刺激に対する応答の活動潜時の比較はほとんどの動物でできなかった。C: DC と P の最短の活動潜時を同時に計測できた結果から、その二つの活動潜時の関係を示したものの。A と同様に、P の活動潜時は常に DC の活動潜時より長く、P の活動潜時 (y) と DC の活動潜時 (x) はよく相関していた ( $r = 0.89$ ;  $y = 1.1x + 3.4$ )。D: AI と P の最短の活動潜時を同時に知れた結果から、その二つの活動潜時の関係を示したものの。C と同様に、P の活動潜時 (y) と DC の活動潜時 (x) はよく相関していた ( $r = 0.86$ ;  $y = 1.1x + 6.0$ )。

## 8 考察

AIとその周辺領野を中心とした計測では、AIおよびDCの吻側の一部、そしてVRとVC、TとRが同定され、それらは全てトノトピー構造を有していた。DCとその周辺領野を中心とした計測では、DCおよびAIの尾側の一部、そしてDCBとVCB、そしてトノトピー構造を有するPが同定された。同定された各領野において活動潜時を解析した結果、AIとDCの間に周波数依存的な活動潜時の差が見られ、高周波帯域 ( $\geq 4$  kHz) で有意にDCの活動潜時がAIのそれより長かった。その他の領野では顕著な周波数依存性は見られなかった。

### 8.1 AIとその周辺領野

本研究において、AIは吻尾方向に最大で4 mm程度、背腹方向に最大で5 mm程度であったが、この大きさは [Wallaceら \(2000\)](#) の定義によるAIの大きさとよく一致していた (図 21 A)。AI腹側に位置するベルト領域にはVR、VCという鏡像対称なトノトピー構造を有する二つの領野の存在が明らかになったが、その位置や大きさ (背腹方向に約1.5 mm) から、この二つの領野は [Wallaceら \(2000\)](#) の定義によるVRBと対応していると考えられる (図 21 A)。本研究においてはAI吻側に隣接または

AI に部分的に包含される R が同定されたが、その位置やトノトピー勾配の向きより、[Redies ら \(1989\)](#) および [Wallace ら \(1999, 2000\)](#) の S と対応していると考えられる (図 21 A)。[Redies ら \(1989\)](#) や [Wallace ら \(1999, 2000\)](#) の研究では、AI の吻側に S の吻側周辺を取り囲むように存在するベルト領域の存在が報告されているが、本研究においてはそれに該当する領野は同定されなかった。その理由の一つとして、本研究で用いられた膜電位感受性色素 RH-795 の蛍光波長がヘモグロビンの吸収波長と近く、偽シルビウス溝上にあるとされるそのベルト領域の応答が、同溝上を走る血管によってマスクされた可能性が挙げられる。血管による応答のマスクを軽減する方法の一つとして、励起光および蛍光の帯域が RH-795 と比べて長波長よりの膜電位感受性色素 (例えば RH-1691、RH-1692) を用いることが考えられる ([Grinvald et al. 1994](#); [Shoham et al. 1999](#))。

AI と DC の境界にあたる領域の腹側部には、[Wallace ら \(2000\)](#) の報告と合致する中間領野が見られ、その領野では今まで知られていなかったトノトピー構造が発見され、そのトノトピー勾配は腹側から背側へ向かっていた。従来の研究では VC の存在や T のトノトピー構造は知られていなかったが、これらの領野が約 3 mm<sup>2</sup> の狭い面積内に密に存在していたことが理由の一つとして考えられる (AI は約 4~5 倍の面積内に一つの領野)。

同じ光計測法を用いた [Horikawa ら \(2001\)](#) の研究では、AI の腹側に VA および V が報告されているが、それらの位置や大きさから、VA は本研究における AI と T、V は本研究における AI または VR の一部である可能性がある (図 21 B)。また、同研究においては、AI 周辺において R および T の存在は報告されていない。

## 8.2 DC とその周辺領野

本研究では、DC およびその周辺の領野の応答振幅や活動潜時の空間分布から、DC 周辺のベルト領域には、DC 尾側にトノトピー構造を有する少なくとも一つの領野 (P) と、トノトピーが見られない二つの領野が存在していることが明らかになったが、微小電極を用いた過去の研究においては、P に該当する領野は知られていなかった (図 21 A)。また、P は吻尾方向に 2 mm 程度の大きさを有していることが分かり、DC 周辺のベルト領域が、lateral groove 上を走る血管付近まで広がっていることが明らかになった (図 21 A)。

[Horikawa ら \(2001\)](#) の研究では、DC の背側方向に D および DP、尾側方向に P および VP、腹側方向に VM が報告されているが、それらの位置や大きさから、D および DP は本研究における DCB、P は本研究における P、VP は 9 匹中 2 匹で P の腹側に見られたトノトピーを有する領野、VM は本研究における DC および VCB の一部であ

る可能性がある (図 21 B)。同研究で定義されている各領野の区分が連続的ではなく、特に D、DP、P、VP が斑点状に描かれているが、その理由として、同研究では応答振幅のみに注目して領野区分を行ったことが考えられる (図 21 B)。本研究においては、DC 周辺においては主に各領野における活動潜時の空間分布に基づいて領野区分を行っており、活動潜時から定められた領野を区分する仮の境界線を応答振幅の最大値の空間分布と重ねあわせ、DC と周辺領野の応答振幅がその境界線を境にして変化することを確認した (図 11)。それにより、DC と周辺領野の明確な境界線を定めることができた。但し、DC と VCB の境界線の一部、P と DCB、P と VCB の境界線の一部は、それら二つの指標によって明確に境界線を定めることはできなかった。これらの領野は、純音や広帯域雑音とは異なるより複雑な音 (例: 振幅変調音、周波数変調音) を用いることで明確にそれぞれの境界線を定めることができるかもしれない。

### 8.3 モルモット聴覚皮質

本研究では同定されなかった DRB を含めると、モルモットの聴覚皮質は少なくとも 10 の領野 (AI, DC, DRB, S, VR, VC, T, VCB, P, DCB) によって構成されている (図 21 A)。領野の数だけに注目すると、霊長類であるマカクザルの聴覚皮質と同等 ([Hackett et al. 2001](#)) であり、げっ歯類の中でもその数は特に多い ([Thomas et al.](#)



[1993](#); [Stiebler et al. 1997](#); [Rutkowski et al. 2003](#); [Polley et al. 2007](#))。また、モルモットの聴覚皮質の各領野の多くはトノトピーを有していた (図 15) が、ヒトを含む霊長類でも同様に、ベルト領域に存在する多くの領野で鏡像対称なトノトピー構造が報告されている ([Hackett et al. 2001](#); [Humphries et al. 2010](#))。その緻密なモルモット聴覚皮質の構造を組織解剖学的に精査し、それらの領野間の連絡を調べると同時に、電気生理学的手法や光計測法を組み合わせ、より高度な音を用いて各領野の特徴付けを行うことで、コア領域やベルト領域の各領野の聴覚情報処理における機能的な位置付けが解明されるかもしれない。しかし、動物間に領野の位置や大きさの個体差が存在するため (図 9 A)、 $1 \text{ mm}^2$  程度の機能的な意味を持つ一つの領野に、選択的に順行性または逆行性のトレーサーを注入して投射や軸索終末の様子を調べることは容易ではない。この問題を解決する一つの有効な手法として、トレーサー注入を行いたいある特定の領野を光計測法により定位し、その後、その場所にトレーサー注入を行う方法が考えられる。この方法により、ベルト領域に存在する二つ以上の領野を組織解剖学的に比較するのも興味深いかもしれない。

#### 8.4 活動潜時と聴覚情報処理

音は数学的に、時間と振幅の二つの次元、または、周波数と複素振幅(振幅と位相)の二つの次元に分離することが可能であり、全ての音は、時間的に変化する振幅情報、時間的に変化する周波数情報、またはそれらの組み合わせによって表現することが可能である。聴覚皮質においては、音の包絡線情報 (= 時間的に変化する振幅情報) に追従して応答する神経細胞が存在し ([Wallace et al. 2005](#))、周波数を場所で表現するトノピーが存在する ([Nishimura et al. 2007](#)) ことから、哺乳類の聴覚情報処理においても、それら二つ情報が重要であると考えられる。

一般的に、入力された信号に対する情報処理を行って何かしらの情報を抽出し、それを出力するシステムには、入力されて出力が得られるまでの遅延時間がある(遅延システムと呼ぶ)。絶対的な時間を与える外部のシステムが存在していなければ、その遅延システム (A) の後段に位置するシステム (C) にとって、(A) に信号が入力された時間は未知である。そのため、1つ次元を有する値が (A) に入力され、その値によって (A) の遅延時間が変化しても、それが (A) と (C) のシステム全体の入出力関係に影響を与えることはない。ところが、(A) のように入力依存的な遅延時間をもつシステム (B) が存在し、(A) と (B) の出力が足し合わされて (C) に入力され、かつ、(C) が過去の入力に対する記憶を有し、その記憶が (C) の出力を変化させる場合に、(A) と (B) の遅延時間の入力依存性が (A)、(B)、そして(C) のシステム全体の入出力関係に影響を与えることになる。

本研究では AI および DC のコア領域において周波数依存的な活動潜時の変化がみられた。この周波数依存的な活動潜時の変化はモルモットのみならず他の哺乳類でも見られ、その共通した特徴は、その動物にとっての低い周波数の音に対しては活動潜時が長く、高い周波数の音に対しては活動潜時が短くなっている (common marmosets: [Philibert et al. 2005](#); owl monkeys: [Recanzone et al. 1999](#); squirrel monkeys: [Cheung et al. 2001](#); cats: [Imaizumi et al. 2004](#); rats: [Polley et al. 2007](#))。また、コア領域内にある細胞は周辺のベルト領域と広く連絡していることが組織解剖学的に知られている ([Wallace et al. 2002](#))。モルモットにおいては、DC 周辺に存在する DCB や VCB においてはトノピー的な応答は見られないため、隣接している DC、または少し離れた AI からの複数の入力を受けて、何かしらの情報統合をしている可能性がある。仮に、DC の中に上記の入力依存的な遅延時間をもつシステム (A) と (B) が存在し、DCB や VCB がシステム (C) であると考えれば、DC における周波数依存的な活動潜時はシステム (A) や (B) の入力依存的な遅延時間に対応する。このシステム構成を想定した場合、上記の考察により、活動潜時の周波数依存性が複雑な周波数情報を含んでいる音に対する DCB や VCB の応答特性の形成に関与している可能性も考えられる。また、従来の研究では AI と DC の活動潜時に有意な差は認められていなかったが、本研究によって、高周波帯域 ( $\geq 4$  kHz) で活動潜時が有意に異なることが

初めて明らかになった (図 18)。高周波帯域における活動潜時の差が、未だに説明されていない AI と DC の機能的な差異の一つの断面になっている可能性がある。

本研究で同定されたベルト領域のうちの一つの領野である P に関して、個別の記録では、AI や DC の活動潜時と P の活動潜時の間には高い相関が見られた (図 20 C;  $r = 0.89$ , 図 20 D;  $r = 0.86$ )。AI や DC の活動潜時には顕著な周波数依存性があり、P の活動潜時は AI や DC の活動潜時とよく相関しているが、P の活動潜時に顕著な周波数依存性は見られなかった (図 19)。このことはコア領域と比較したときの P における活動潜時のジッターの増大に起因していると考えられる。実際に図 20 C が示すように、DC における活動潜時は 14 ms から 29 ms に分布しているが、P における活動潜時は 14 ms から 34 ms に分布している (その幅で 15 ms in DC vs. 20 ms in P)。また、これらの結果は DC と P の活動潜時の差は固定時間ではなく、DC の活動潜時と相関していることを示している。

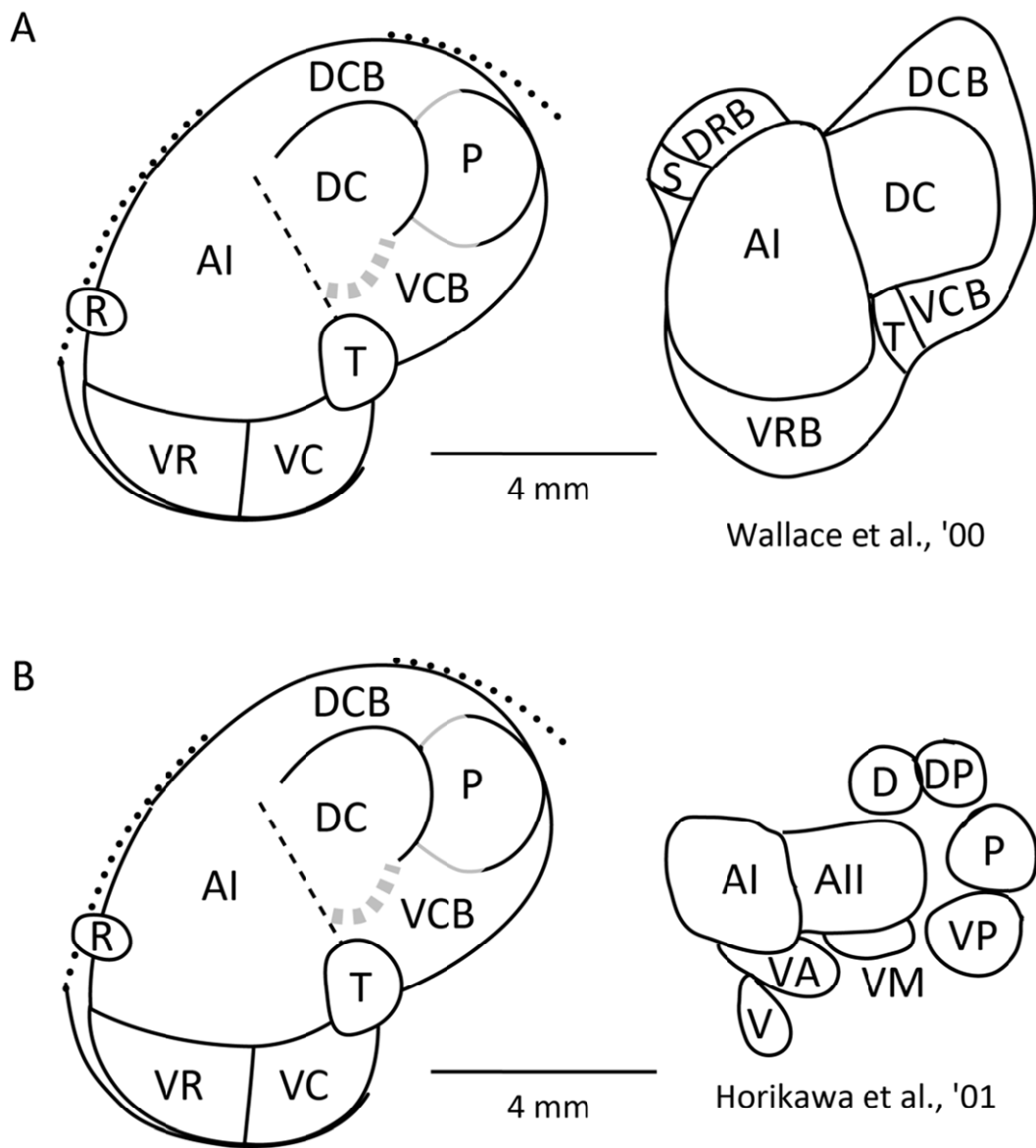


図 21. 本研究で同定されたモルモット聴覚皮質各領野と、先行研究で報告されていた各領野の比較。A: [Wallace ら \(2000\)](#) が微小電極を用いて同定した各領野(右)との比較。点線は偽シルビウス溝 (左) と lateral groove (右)。B: [Horikawa ら \(2001\)](#) が膜電位感受性色素を用いた光計測法により同定した各領野(右)との比較。[Horikawa ら \(2001\)](#) の研究においては、すべての領野において、純音刺激に対する皮質の応答振幅を 2 値化したものを用いてその区分を調べた。AとBのスケールバーは左の図と右の図で共通して適用される。各領野の名称は本文中の略語一覧を参照されたい。

## 9 結語

膜電位感受性色素を用いた光計測法によって、モルモット大脳皮質聴覚野の純音または広帯域雑音によって惹起された活動の時空間応答様式を  $62.5 \times 62.5 \mu\text{m}^2$  の空間分解能で記録し、各領野の応答振幅、各領野における活動潜時の空間分布の二つの指標を用いて同聴覚皮質の領野区分を定義した。その結果、微小電極による過去の研究で知られていた全ての領野の存在が確認され、加えて、VRB の中に鏡像対称なトノピー構造を有する VR と VC という新たな領野区分が発見された。また、従来は知られていなかった中間領野のトノピー構造も明らかになった。さらに、応答振幅のみからでは同定が困難な、DC とその周辺領野の境界を、複数の純音によって惹起された各応答の活動潜時の空間分布により定義し、それが、広帯域雑音によって惹起された活動の最大応答振幅の空間分布で現れる特徴的な淵と合致していることを確認した。それらの領野区分を元にして、各領野の特徴付けの一つとして活動潜時の周波数依存性を解析し、DC の活動潜時が高周波帯域 ( $\geq 4 \text{ kHz}$ ) において有意に AI より長いことを新たに発見した。

光計測法によりモルモット聴覚皮質の領野区分を明らかにすることは可能であり、その高い時間および空間分解能により、今まで知られていなかった領野の存在や、いくつかの領野の周波数依存的な応答様式を明らかにすることができた。

## 10 参考文献

**Cheung SW, Bedenbaugh PH, Nagarajan SS, Schreiner CE.** Functional organization of squirrel monkey primary auditory cortex: responses to pure tones. *J Neurophysiol.* 2001; 85(4):1732-49.

**Cohen LB, Salzberg BM, Grinvald A.** Optical methods for monitoring neuron activity. *Annu Rev Neurosci* 21: 171–182, 1978.

**Cooke JE, Zhang H, Kelly JB.** Detection of sinusoidal amplitude modulated sounds: deficits after bilateral lesions of auditory cortex in the rat. *Hear Res.* 2007; 231(1-2):90-9.

**Fukunishi K, Murai N, Uno H.** Dynamic characteristics of the auditory cortex of guinea pigs observed with multichannel optical recording. *Biol Cybern* 67: 501–509, 1992.

**Grinvald A, Lieke EE, Frostig RD, Hildesheim R.** Cortical point-spread function and long-range lateral interactions revealed by real-time optical imaging of macaque monkey primary visual cortex. *J Neurosci* 14: 2545–2568, 1994.

**Hackett TA, Preuss TM, Kaas JH.** Architectonic identification of the core region in auditory cortex of macaques, chimpanzees, and humans. *J Comp Neurol.* 441:197-222, 2001.

**Hellweg FC, Koch R, Vollrath M.** Representation of the cochlea in the neocortex of guinea pigs. *Exp Brain Res* 29: 467–474, 1977.

**Horikawa J, Hess A, Nasu M, Hosokawa Y, Scheich H, Taniguchi I.** Optical imaging of neural activity in multiple auditory cortical fields of guinea pigs. *Neuroreport* 12: 3335–3339, 2001.

**Humphries C, Liebenthal E, Binder JR.** Tonotopic organization of human auditory cortex. *Neuroimage*. 2010; 50(3):1202-11.

**Imaizumi K, Priebe NJ, Crum PA, Bedenbaugh PH, Cheung SW, Schreiner CE.** Modular functional organization of cat anterior auditory field. *J Neurophysiol*. 2004; 92(1):444-57.

**Kaas JH, Hackett TA.** Subdivisions of auditory cortex and processing streams in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 11793–11799, 2000.

**Lomber SG, Malhotra S.** Double dissociation of 'what' and 'where' processing in auditory cortex. *Nat Neurosci*. 2008; 11(5):609-16.

**Merzenich MM, Brugge JF.** Representation of the cochlear partition of the superior temporal plane of the macaque monkey. *Brain Res* 50: 275–296, 1973.

**Nishimura M, Shirasawa H, Song WJ.** A light-emitting diode light source for imaging of neural activities with voltage-sensitive dyes. *Neurosci Res* 54: 230–234, 2006.



**Nishimura M, Shirasawa H, Song WJ.** New Field With Tonotopic Organization in Guinea

Pig Auditory Cortex. *J Neurophysiol* 97: 927–932, 2007.

**Nishimura M, Song WJ.** Formulation for reduction of noise in fractional signal

estimation in imaging studies. *Neuro2010*. P3-r17, 2010.

**Philibert B, Beitel RE, Nagarajan SS, Bonham BH, Schreiner CE, Cheung SW.** Functional

organization and hemispheric comparison of primary auditory cortex in the common

marmoset (*Callithrix jacchus*). *J Comp Neurol*. 2005; 487(4):391-406.

**Polley DB, Read HL, Storace DA, Merzenich MM.** Multiparametric auditory receptive

field organization across five cortical fields in the albino rat. *J Neurophysiol*. 2007;

97(5):3621-38.

**Reale RA, Imig TJ.** Tonotopic organization in auditory cortex of the cat. *J Comp Neurol*

192: 265–291, 1980.

**Recanzone GH, Schreiner CE, Sutter ML, Beitel RE, Merzenich MM.** Functional

organization of spectral receptive fields in the primary auditory cortex of the owl

monkey. *J Comp Neurol*. 1999; 415(4):460-81.

**Redies H, Sieben U, Creutzfeldt OD.** Functional subdivisions in the auditory cortex of

the guinea pig. *J Comp Neurol* 282: 473–488, 1989.

**Rutkowski RG, Miasnikov AA, Weinberger NM.** Characterisation of multiple physiological fields within the anatomical core of rat auditory cortex. *Hear Res* 181: 116–130, 2003.

**Shoham D, Glaser DE, Arieli A, Kenet T, Wijnbergen C, Toledo Y, Hildesheim R, Grinvald A.** Imaging cortical dynamics at high spatial and temporal resolution with novel blue voltage-sensitive dyes. *Neuron*. 1999; 24(4):791-802.

**Song WJ, Kawaguchi H, Totoki S, Inoue Y, Katura T, Maeda S, Inagaki S, Shirasawa H, Nishimura M.** Cortical intrinsic circuits can support activity propagation through an isofrequency strip of the guinea pig primary auditory cortex. *Cereb Cortex* 16: 718–729, 2006.

**Spatz WB, Vogt DM, Illing RB.** Delineation of the striate cortex, and the striate-peristriate projections in the guinea pig. *Exp Brain Res*. 1991; 84(3):495-504.

**Stiebler I, Neulist R, Fichtel I, Ehret G.** The auditory cortex of the house mouse: left-right differences, tonotopic organization and quantitative analysis of frequency representation. *J Comp Physiol A*. 1997; 181(6):559-71.

**Talwar SK, Musial PG, Gerstein GL.** Role of mammalian auditory cortex in the perception of elementary sound properties. *J Neurophysiol*. 2001; 85(6):2350-8.

**Thomas H, Tillein J, Heil P, Scheich H.** Functional organization of auditory cortex in the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). I. Electrophysiological mapping of frequency representation and distinction of fields. *Eur J Neurosci* 5: 882–897, 1993.

**Wallace MN, Rutkowski RG, Palmer AR.** A ventrorostral belt is adjacent to the guinea pig primary auditory cortex. *Neuroreport* 10: 2095–2099, 1999.

**Wallace MN, Rutkowski RG, Palmer AR.** Identification and localisation of auditory areas in guinea pig cortex. *Exp Brain Res* 132: 445–456, 2000.

**Wallace MN, Rutkowski RG, Palmer AR.** Interconnections of auditory areas in the guinea pig neocortex. *Exp Brain Res* 143: 106–119, 2002.

**Wallace MN, Shackleton TM, Anderson LA, Palmer AR.** Representation of the purr call in the guinea pig primary auditory cortex. *Hear Res.* 2005; 204(1-2):115-26.